

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE VETERINARIA
Departamento de Sanidad Animal



TESIS DOCTORAL

**Efecto *in vitro* de interferón de tipo I sobre la expresión de
retrovirus felinos y evaluación de su aplicación terapéutica en
gatos con infección natural**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Victorio Manuel Collado Alcalá

Directores

Esperanza Gómez-Lucía y Duato

Ana Doménech Gómez

Guadalupe Miró Corrales

Madrid, 2017

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE VETERINARIA

DEPARTAMENTO SANIDAD ANIMAL



“Efecto *in vitro* del interferón de tipo I sobre la expresión de Retrovirus felinos y evaluación de su aplicación en gatos con infección natural”

MEMORIA PRESENTADA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR POR

VICTORIO MANUEL COLLADO ALCALÁ

MADRID, 2015

TESIS DOCTORAL

“EFECTO *IN VITRO* DEL INTERFERÓN DE TIPO I SOBRE LA EXPRESIÓN DE RETROVIRUS FELINOS Y EVALUACIÓN DE SU APLICACIÓN EN GATOS CON INFECCIÓN NATURAL”

**MEMORIA PRESENTADA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR POR
VICTORIO MANUEL COLLADO ALCALÁ**

DIRECTORAS DE TESIS

ESPERANZA GÓMEZ-LUCÍA Y DUATO

CATEDRÁTICA DEL DEPARTAMENTO DE SANIDAD ANIMAL
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE

ANA DOMÉNECH GÓMEZ

PROFESORA TITULAR DEL DEPARTAMENTO DE SANIDAD ANIMAL
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE

GUADALUPE MIRÓ CORRALES

PROFESORA TITULAR DEL DEPARTAMENTO DE SANIDAD ANIMAL
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE

El trabajo de esta Tesis Doctoral se ha realizado gracias a la beca predoctoral del **Ministerio de Ciencia y Tecnología** concedida a D. Victorio Manuel Collado Alcalá, y ha sido financiada por el proyecto AGL2005- 05248/GAN y el Grupo de Investigación UCM Retrovirus Animales, UCM 920620.

Este trabajo no habría sido posible sin la colaboración de muchas personas a las cuales quiero mostrar mi agradecimiento

A la Dras. Esperanza Gómez-Lucía Duato, Ana Doménech Gómez y Guadalupe Miró Corrales.

A las Dras. Sonsoles Martín y Elena Escolar.

Al personal del Departamento de Sanidad Animal de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense.

Al personal del Laboratorio de Biopatología, del Laboratorio de Microbiología y Parasitología y de la Consulta de Enfermedades Infecciosas y Parasitarias del Hospital Clínico Veterinario de la Universidad Complutense.

Al personal del Centro de Citometría de Flujo y Microscopía Confocal y del Centro de Proceso de Datos de la Universidad Complutense.

A las clínicas veterinarias colaboradoras del proyecto.

A Lupe, Espe y Ana

A las compañeras y amigas de Sanidad Animal en especial a Ana, Belén y Rocío.

A Teresa, Bruno, Esther, Alberto, Nuria, Wouter, Rosa, Rafa, Lucía, Quique, Paco, Susana, Manuel, Cristina, Pilar, Patricia, Pedro, Sonsoles, Natalia, Marga, Miriam, Isabel, Llanos, Marta, Carmen, Mamen, Eva, Ana...

A Almira, Cristina, Verena, Ester, Carlos, Ana, Alfonso, Chus, Angélica, Rocío y Manuel.

A mi hermano, mi tío y mi abuelo

A mis padres

Para Mama y Papa

Para Elena

El ser humano no es un árbol frutal que sólo se cultive por la cosecha

Emilia Pardo Bazán

ÍNDICE

RESUMEN / SUMMARY 1

INTRODUCCIÓN 9

1.1. GENERALIDADES DE LOS RETROVIRUS	11
1.1.1. Clasificación	11
1.1.2. Estructura genética y proteínas	12
1.1.3. Infección y replicación vírica.....	12
1.2. LEUCEMIA FELINA.....	13
1.2.1. Etiología.....	13
1.2.1.1. Virus de la Leucemia Felina (FeLV).....	13
1.2.1.2. Clasificación de FeLV	15
1.2.2. Epidemiología	16
1.2.2.1. Distribución y prevalencia.....	16
1.2.2.2. Fuentes de infección y transmisión	16
1.2.2.3. Factores que influyen en la transmisión del virus.....	16
1.2.3. Patogenia.....	17
1.2.3.1. Evolución de la infección.....	17
1.2.3.2. Respuesta inmunitaria	19
1.2.4. Cuadro clínico	19
1.2.4.1. Linfomas, leucemias y enfermedades mieloproliferativas	20
1.2.4.2. Síndrome de supresión de la médula ósea.....	21
1.2.4.3. Inmunosupresión	22
1.2.4.4. Otros signos clínicos	22
1.2.5. Diagnóstico	23
1.2.5.1. Pruebas serológicas	23
1.2.5.2. Pruebas virológicas.....	23
1.2.5.3. Pruebas moleculares	24
1.2.5.4. Protocolo diagnóstico e interpretación de resultados	24
1.2.6. Tratamiento	25
1.2.6.1. Tratamiento inmunomodulador.....	25
1.2.6.2. Tratamiento antivírico	25
1.2.7. Inmunoprofilaxis	25
1.3. INMUNODEFICIENCIA FELINA.....	27
1.3.1. Etiología.....	27
1.3.1.1. Virus de la Inmunodeficiencia Felina (FIV)	27
1.3.1.2. Clasificación de FIV	28
1.3.1.3. Replicación vírica.....	28
1.3.2. Epidemiología	28
1.3.2.1. Distribución y prevalencia.....	28
1.3.2.2. Hospedadores	29
1.3.2.3. Fuentes de infección y transmisión	29
1.3.2.4. Factores de riesgo	29
1.3.3. Patogenia.....	30
1.3.3.1. Evolución de la infección.....	30
1.3.3.2. Respuesta inmunitaria.....	31
1.3.3.3. Neuropatogenia	32

1.3.4. Cuadro clínico.....	32
1.3.4.1. Manifestaciones clínicas asociadas	33
1.3.5. Diagnóstico.....	33
1.3.5.1. Pruebas serológicas	34
1.3.5.2. Pruebas virológicas	34
1.3.5.3. Pruebas moleculares.....	34
1.3.5.4. Protocolo diagnóstico e interpretación de los resultados	35
1.3.6. Tratamiento de la inmunodeficiencia felina.....	35
1.4. INTERFERÓN	37
1.4.1. Introducción histórica.....	37
1.4.2. Naturaleza, tipos e importancia del interferón en la inmunidad.....	38
1.4.3. Inducción de genes productores de interferón	39
1.4.4. Genes y proteínas inducidos por interferón.....	40
1.4.5. Actividad antivírica de los interferones tipo I.....	41
1.4.6. Actividad antitumoral de los interferones tipo I.....	42
1.4.7. Actividad proapoptótica de los interferones tipo I.....	43
1.4.8. Mecanismos de evasión de los virus frente a los efectos del Interferón Tipo I.....	44
1.4.9. Efectos secundarios o colaterales del interferón en las células	45
1.4.10. Papel y uso del interferón en retrovirosis.....	45
1.4.10.1. El interferón en las infecciones retrovirales	45
1.4.10.2. El tratamiento con interferón en las infecciones retrovirales.....	46
1.4.11. Aplicaciones del interferón en Retrovirosis Felinas.....	47
JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS	49
MATERIAL Y MÉTODOS	53
3.1. ESTUDIOS IN VITRO.....	55
3.1.1. Interferones.....	55
3.1.2. Líneas celulares y mantenimiento de los cultivos.....	55
3.1.3. Virus empleados y titulación de FIV _{GL8}	55
3.1.4. Condiciones experimentales de los cultivos.....	56
3.1.5. Análisis de viabilidad celular y apoptosis por citometría de flujo.....	57
3.1.6. Determinación de las proteínas de la cápsida, p27 de FeLV y p24 de FIV.....	57
3.1.7. Determinación de la actividad retrotranscriptasa (RT)	58
3.1.8. Extracción de ADN cromosómico	58
3.1.9. Extracción de ARN de las células y obtención de ADN complementario (ADNc).....	58
3.1.10. Cuantificación del ARN vírico mediante PCR a tiempo real.....	59
3.1.11. Análisis estadístico de los experimentos <i>in vitro</i>	59
3.2. ESTUDIOS IN VIVO	60
3.2.1. Población de estudio	60
3.2.2. Manejo, alojamiento y alimentación de los animales.....	61
3.2.3. División en grupos de los gatos	61
3.2.4. Tratamiento con interferón y pauta de administración.....	61
3.2.5. Toma de muestras	61
3.2.6. Procesamiento de las muestras.....	62
3.2.7. Hemograma y perfil bioquímico	63

3.2.8. Separación de las proteínas plasmáticas por electroforesis (Proteinograma).....	64
3.2.9. Determinación del cociente CD4/CD8 mediante citometría de flujo	65
3.2.10. Determinación de anticuerpos anti-IFN- α	65
3.2.11. Determinación de las proteínas de la cápsida p27 de FeLV y p24 de FIV	66
3.2.12. Determinación de la actividad retrotranscriptasa (RT)	66
3.2.13. Extracción de ADN cromosómico de las muestras	66
3.2.14. Determinación de la presencia de ADN proviral de FeLV y FIV por PCR.....	66
3.2.15. Cuantificación de ADN en la muestra mediante PCR a tiempo real	67
3.2.16. Cuantificación de provirus en sangre periférica por PCR a tiempo real	69
3.2.17. Análisis estadístico de los estudios <i>in vivo</i>	69

RESULTADOS

71

4.1. ESTUDIOS IN VITRO 73

4.1.1. Efecto del interferón sobre las células U937	73
4.1.2. Efecto del interferón sobre las células crónicamente infectadas por FeLV (FL74).....	73
4.1.2.1. Efecto en la expresión de la proteína p27.....	73
4.1.2.2. Efecto en la actividad retrotranscriptasa (RT)	74
4.1.2.3. Efecto sobre la viabilidad celular y la apoptosis	76
4.1.2.4. Efecto sobre el número de copias de ARN vírico	79
4.1.3. Efecto del interferón sobre las células FeTJ.....	80
4.1.4. Efecto del interferón sobre las células FeTJ infectadas por FIV _{GL8} (FeTJ-FIV _{GL8})	81
4.1.4.1. Efecto en la expresión de la proteína p24.....	81
4.1.4.2. Efecto sobre la actividad retrotranscriptasa (RT).....	82
4.1.4.3. Efecto sobre la viabilidad celular y la apoptosis	84
4.1.4.4. Efecto sobre el número de copias de ARN vírico	86

4.2. POBLACIÓN DE ESTUDIO Y SITUACIÓN INICIAL DE LOS GATOS DEL ESTUDIO IN VIVO PARA VALORAR LA EFICACIA DEL RFEIFNA(2A) (ROFERON®) EN EL TRATAMIENTO DE LAS INFECCIONES POR FIV Y POR FELV 87

4.2.1. Reseña de los gatos.....	87
4.2.2. Situación clínica inicial de la población felina	90
4.2.3. Situación inicial de la analítica sanguínea de la población felina	96
4.2.3.1. Hemograma	96
4.2.3.2. Formula leucocitaria.....	99
4.2.3.3. Perfil bioquímico	102
4.2.3.4. Análisis y electroforesis de las proteínas plasmáticas (proteinograma)	102
4.2.3.5. Cociente de poblaciones CD4 ⁺ /CD8 ⁺	106
4.2.4. Situación de la infección vírica de los gatos incluidos en el estudio.....	108
4.2.4.1. Proteínas víricas p24 y p27.....	108
4.2.4.2. Actividad retrotranscriptasa (RT).....	108
4.2.4.3. Carga provírica	109
4.2.4.4. Correlaciones entre los parámetros víricos y los demás parámetros estudiados	110

4.3. SEGUIMIENTO Y EVOLUCIÓN DE LA RESPUESTA AL TRATAMIENTO DE LOS GATOS TRATADOS CON ROFERON®. 111

4.3.1. Seguimiento de la exploración y valoración clínica de la población incluida en el ensayo con Roferon®	111
4.3.2. Seguimiento de la analítica sanguínea de la población incluida en el ensayo con Roferon®	114
4.3.2.1. Hemograma	114

4.3.2.2. Formula leucocitaria	118
4.3.2.3. Perfil bioquímico.....	121
4.3.2.4. Análisis y electroforesis de las proteínas plasmáticas (proteinograma)	124
4.3.2.5. Cociente de poblaciones CD4 ⁺ /CD8 ⁺	129
4.3.2.6. Detección de anticuerpos anti-interferón α	131
4.3.3. Resultados y seguimiento de la infección vírica de la población incluida en el ensayo con Roferon®	132
4.3.3.1. Proteínas víricas p27	132
4.3.3.2. Actividad retrotranscriptasa (RT) de FeLV	133
4.3.3.3. Carga provírica de FeLV	135
4.3.3.4. Carga provírica de FIV	137
4.3.3.5. Resultados conjuntos de la virología en los gatos FeLV ⁺	139

DISCUSIÓN

141

5.1. ESTUDIOS IN VITRO..... 143

5.1.1. Efecto sobre la expresión de los virus.....	143
5.1.2. Efecto sobre la viabilidad y la apoptosis celular	145
5.1.3. Comparación de los subtipos de interferón analizados	146

5.2. POBLACIÓN DE ESTUDIO Y SITUACIÓN INICIAL DE LOS GATOS DEL ESTUDIO IN VIVO PARA VALORAR LA EFICACIA DEL RFEIFNA(2A) (ROFERON®) EN EL TRATAMIENTO DE LAS INFECCIONES POR FIV Y POR FELV 148

5.2.1. Reseña de la población felina.....	148
5.2.2. Situación clínica inicial de la población felina.....	149
5.2.3. Situación de la analítica sanguínea de la población felina	151
5.2.3.1. Hemograma.....	151
5.2.3.2. Formula leucocitaria	153
5.2.3.3. Perfil bioquímico.....	156
5.2.3.4. Análisis y electroforesis de las proteínas plasmáticas (proteinograma)	157
5.2.3.5. Cociente de poblaciones CD4 ⁺ /CD8 ⁺	159
5.2.3.6. Serie plaquetar	160
5.2.4. Situación de la infección vírica de la población felina.....	160
5.2.4.1. Proteínas víricas p24 y p27	160
5.2.4.2. Actividad retrotranscriptasa (RT)	161
5.2.4.3. Carga provírica.....	162

5.3. SEGUIMIENTO Y EVOLUCIÓN DE LA RESPUESTA AL TRATAMIENTO DE LOS GATOS TRATADOS CON ROFERON® 163

5.3.1. Seguimiento de la exploración y valoración clínica de la población incluida en el ensayo con Roferon®	163
5.3.2. Seguimiento de la analítica sanguínea de la población incluida en el ensayo con Roferon®	165
5.3.2.1. Hemograma.....	165
5.3.2.2. Formula leucocitaria	166
5.3.2.3. Perfil bioquímico.....	167
5.3.2.4. Análisis y electroforesis de las proteínas plasmáticas (proteinograma)	168
5.3.2.5. Cociente de poblaciones CD4 ⁺ /CD8 ⁺	170
5.3.2.6. Detección de anticuerpos anti-Interferón	171
5.3.3. Resultados y seguimiento de la infección vírica de la población incluida en el ensayo con Roferon®	172
5.3.3.1. Proteínas víricas p27 y Actividad retrotranscriptasa (RT) de FeLV	172

5.3.3.2. Carga provírca de FeLV y FIV	173
5.3.4. Compilación de resultados y seguimiento de la población incluida en el ensayo con Roferon®	173
CONCLUSIONES	175
BIBLIOGRAFÍA	179
ANEXOS	199
FORMULARIO DE INCORPORACIÓN AL ESTUDIO DE ROFERON®	201
FICHA CLÍNICA DE LOS GATOS INCLUIDOS EN EL ESTUDIO CON ROFERON®	202
CONSENTIMIENTO INFORMADO	203
RESULTADOS NUMÉRICOS DE LAS ANALÍTICAS	205

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

A/G	Cociente albúmina-globulina
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	Ácido dextrirribonucleico complementario
ALT	Alanina amino transferasa
ARN	Ácido ribonucleicos
AZT	Zidovudina
BLV	Virus de la leucemia bovina
CC50	Concentración citotóxica 50
EMEA	Agencia Europea para Evaluación de Medicamentos
Eritro.	Recuento de eritrocitos
FAIDS	Síndrome de inmunodeficiencia adquirida felina
FeLV	Virus de la leucemia felina
FeLV+	Infectado por virus leucemia felina
FeSV	Virus del sarcoma felino
FIV	Virus de la inmunodeficiencia felina
FIV+	Infectado por virus de la inmunodeficiencia felina
G.C.	Grupo clínico
GAPDH	Gliceraldehído- 3 fosfato deshidrogenasa
H.C.	Hembra castrada
H.E.	Hembra entera
Hgb.	Concentración de hemoglobina
HIV	Virus de la inmunodeficiencia humana
HIV+	Infectado por virus de la inmunodeficiencia humana
Htc.	Hematocrito
HTLV	Virus linfotrópico humano de células T
IC50	Concentración inhibitoria 50
IFD	Inmunofluorescencia directa
IFN	Interferón
IFN-I	Interferón tipo I
IFN-II	Interferón tipo II
Ig	Inmunoglobulina
IP	Ioduro de propidio
LeC	Leucocitosis
LeP	Leucopenia
Leuc	Número de leucocitos

LiC	Linfocitosis
Linf	Número de linfocitos
LiP	Linfopenia
LTR	Repeticiones terminales largas
M.C.	Macho castrado
M.E.	Macho entero
MuLV	Virus de la leucemia murina
NeF	Neutrofilia
NeP	Neutropenia
NK	natural killer
Ntrf	Número de neutrófilos
P.C.	Puntuación clínica
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PKR	Proteín quinasa R
qPCR	Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa
RT	Retrotranscriptasa
RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa con retrotranscriptasa
SFB	Suero fetal bovino
SIDA	Síndrome de inmunodeficiencia adquirida
SIV	Virus de la inmunodeficiencia en simios
SNC	Sistema nervioso central
TNF	Factor de necrosis tumoral
V0	Visita cero / inicio tratamiento
V1	Primera visita / mitad tratamiento
V2	Segunda visita / final tratamiento
V3	Tercera visita / cuatro-ocho meses después del tratamiento

RESUMEN / SUMMARY

La leucemia y la inmunodeficiencia felinas son dos enfermedades muy importantes en la clínica de pequeños animales aunque las campañas de vacunación y control que se están llevando a cabo hayan reducido significativamente su prevalencia e incidencia.

A día de hoy, no existe un tratamiento curativo para ninguna de las dos infecciones, lo que está obligando a los veterinarios a utilizar, en muchas ocasiones de forma empírica, antivíricos y/o inmunomoduladores para controlar el progreso de la infección, alentados por los resultados positivos obtenidos con el virus de la inmunodeficiencia humana. Entre estos inmunomoduladores se encuentra un interferón recombinante humano (rHuIFN- α), registrado para medicina humana y utilizado en pacientes infectados por el virus de la inmunodeficiencia humana (HIV⁺). Este IFN- α humano ofrece la ventaja de su fácil aplicación (vía oral) y su bajo coste, lo que hace que sea una alternativa muy interesante para el tratamiento de ambas retrovirus.

Por estos motivos se propuso como objetivo general de esta Tesis Doctoral estudiar el efecto del IFN- α en gatos con infección natural por el virus de la leucemia felina (FeLV) y el virus de la inmunodeficiencia felina (FIV) analizando distintos parámetros: cuadro clínico, alteraciones biopatológicas y evolución vírica. Este objetivo se desarrolló en tres subobjetivos:

1. **Análisis del efecto *in vitro*** sobre la expresión vírica, la actividad retrotranscriptasa RT, la viabilidad celular, la apoptosis y el ARN vírico del IFN- α 2a recombinante humano, el IFN- α (A/D) recombinante humano, y el IFN- ω recombinante felino en cultivos celulares linfoides infectados por FeLV y FIV.
2. **Estudio de la situación inicial** clínica, analítica y de la infección vírica de una población de gatos con infección natural por FeLV o FIV, para determinar las alteraciones y correlaciones significativas en ambas infecciones, y poder tenerlas como referencia para desarrollar el subobjetivo 3.
3. **Evaluación de la evolución** de la situación clínica, analítica y de la infección vírica en la población de gatos objeto de estudio tras aplicar el tratamiento por vía oral con IFN- α 2a recombinante humano (Roferon®).

En los estudios *in vitro* tras la administración de interferón se observó que, aunque ninguno de los tres tipos empleados afectó a la síntesis de proteínas víricas (evaluadas a través de la expresión de la p27 de FeLV y de la p24 de FIV), sí se produjo una disminución estadísticamente significativa del número de partículas víricas infectivas (evaluadas a través de la presencia de transcriptasa inversa, RT) dependiente del tiempo de exposición y de la concentración de IFN. Esto indujo a pensar que el IFN reducía la formación de partículas víricas en células infectadas por FeLV o FIV en un punto de la replicación vírica post traducción: en la maduración, ensamblaje y/o liberación de partículas víricas. Los experimentos confirmaron que la viabilidad de las células infectadas disminuía con el tratamiento, constatando que en el caso de la infección por FeLV era debida al desarrollo de apoptosis, y en el caso de FIV era debida a necrosis celular. Por tanto, el tratamiento con IFN redujo la liberación de partículas víricas, posiblemente asociada a la alteración de las membranas celulares durante la apoptosis y necrosis de las células, disminuyendo eficazmente la carga vírica y limitando la expansión de la infección a otras células.

Una vez comprobado el efecto *in vitro* del IFN, se propuso analizar su efecto *in vivo* en gatos con infección natural por estos virus. Se incluyeron en el estudio 27 gatos infectados por FeLV (FeLV⁺), y 31 infectados por FIV (FIV⁺) todos ellos gatos de propietario en el momento del estudio aunque su origen pudiera ser vagabundo. En los gatos FeLV⁺ y FIV⁺ se observaron cuadros clínicos más patentes en machos que en hembras, aunque las diferencias no fueron muy marcadas, a diferencia de la presentación por edades en las infecciones por estos retrovirus. Así, la edad más representada en gatos FeLV⁺ fue menor de un año, y en los FIV⁺ fue de tres años. Como cabría esperar, los signos clínicos más prevalentes fueron muy inespecíficos en ambas infecciones, con predominio de disorexia, astenia, lesiones orales, palidez de mucosas y alteraciones respiratorias. Se adjudicó a cada gato una puntuación clínica en función de los signos clínicos observados, no

encontrando diferencias significativas entre gatos FeLV⁺ y FIV⁺. Todo esto hacía pensar que la clínica observada podría ser debida a alteraciones biopatológicas, fundamentalmente en los parámetros relacionados con la serie roja y la serie blanca. La analítica clínica de los gatos confirmó esta sospecha, siendo la anemia, la neutropenia y la leucopenia las alteraciones más frecuentes, aunque no se pudieron relacionar con el estado clínico. Sin embargo, sí se observó que en los gatos FIV⁺ generalmente estuvieron alterados los recuentos de neutrófilos o de linfocitos, mientras que el 58,3% de los gatos FeLV⁺ tuvieron estas dos poblaciones celulares alteradas. Esto podría indicar que FeLV infecta a precursores de la serie blanca en la médula ósea, mientras que FIV afecta a células maduras. En relación con los linfocitos, un parámetro que indica claramente el progreso de la infección, especialmente por FIV, es el cociente CD4⁺/CD8⁺, ya que este virus tiene como diana fundamental los linfocitos T CD4⁺. Se observó que los gatos FIV⁺ con un cuadro clínico más grave presentaron un cociente CD4⁺/CD8⁺ más bajo. Esto mismo se reprodujo en los gatos FeLV⁺, aunque los valores del dicho cociente permanecieron en la mayoría de las veces dentro del rango de normalidad.

Otra alteración frecuente fue la hipergammaglobulinemia, presente en el 40,7% de los gatos FeLV⁺, y en el 80,6% de los FIV⁺. En la infección por FeLV las alteraciones del proteinograma pueden asociarse con infecciones secundarias y oportunistas, ya que se observaron fundamentalmente en animales con signos clínicos, mientras que en el caso de FIV podrían estar causadas directamente por el virus, al no observarse diferencias significativas entre los gatos con y sin cuadro clínico.

La valoración de la situación virológica se puede realizar a través de la concentración de proteínas víricas (como la p27 de FeLV o la p24 de FIV), la actividad RT, y la carga provírica (por PCR cuantitativa). En los gatos FIV⁺ no se detectó p24 ni actividad RT, posiblemente por el bajo número de partículas víricas circulantes. En contraposición, en los gatos FeLV⁺ la actividad RT estuvo aumentada en relación con la gravedad de la enfermedad ($p < 0,05$). Todos los gatos fueron positivos a la PCR cuantitativa, pero no se observaron diferencias significativas con respecto a la gravedad del cuadro clínico.

Los 58 gatos incluidos en el estudio anterior fueron tratados con Roferon® (rHuIFN- α) durante cuatro meses por vía oral, a razón de 60 UI/día en semanas alternas, administrado por los propietarios. Se revisó el estado clínico y se tomaron muestras a mitad de tratamiento, alrededor del mes 2 (V1), al finalizar el mismo, alrededor del mes 4 (V2), y 8-12 meses tras el comienzo del mismo (V3). Tres gatos, que habían presentado una situación inicial muy deteriorada, murieron a lo largo del periodo de tratamiento. Los demás mejoraron ostensiblemente su puntuación clínica, pasando en muchos casos a no presentar ningún signo clínico. La administración de Roferon® mejoró los procesos anémicos observados al inicio del estudio (V0), al menos en los cuadros leves o moderados. También se observó el aumento transitorio de los recuentos de neutrófilos y linfocitos, de modo que los porcentajes de gatos con leucopenia, neutropenia y linfopenia se redujeron, incrementando los gatos con neutrofilia y linfocitosis. Este efecto del IFN podría implicar una mejor respuesta del gato infectado a las infecciones por microorganismos secundarios y oportunistas. Posiblemente relacionado con este efecto, se detectó un incremento de la concentración de gammaglobulinas durante el estudio, mostrando hipergammaglobulinemia más del 80% de los gatos FeLV⁺ y FIV⁺ en algún momento de la evolución.

Además de la situación clínica, durante el estudio se observó una mejora patente de los parámetros más relacionados con la infección vírica, tales como el cociente CD4⁺/CD8⁺ (que fue más alto al finalizar el tratamiento en gatos tanto FeLV⁺ como FIV⁺), la concentración de la proteína p27, la actividad RT y la carga provírica de los gatos FeLV⁺ (que alcanzaron los valores más bajos al finalizar el tratamiento).

A pesar de observar una evidente evolución favorable en la situación clínica, biopatológica y virológica en el estudio, un hecho que se presentó casi de forma invariable fue un empeoramiento de todos los parámetros analizados durante la V3, es decir, a los 4-8 meses tras finalizar el tratamiento. Esto induce a plantear en un futuro una modificación del protocolo de tratamiento.

En definitiva, la administración oral de Roferon® es una alternativa terapéutica que el veterinario clínico debería contemplar en el tratamiento de gatos FeLV⁺ y FIV⁺, por la mejoría clínica, analítica y de los parámetros virológicos demostrados en este estudio. Al finalizar un ciclo de tratamiento con Roferon® debe tenerse en cuenta que los efectos positivos no se mantienen a medio-largo plazo, por lo que sería necesario ampliar el periodo de tratamiento para consolidar esta evolución favorable en el tiempo. Serían necesarios estudios a más largo plazo que permitieran establecer un protocolo que garantice el mantenimiento de estos efectos positivos en el tiempo, así como el impacto orgánico y vírico que puede conllevar.

Feline leukemia and feline immunodeficiency are two important diseases in small animal medicine. Currently, vaccination and control campaigns have significantly reduced their prevalence and incidence. However there is no cure any of these infections. Practitioners prescribe antiviral and/or immunomodulatory therapy to delay the disease progression, mainly, based on the positive results obtained with HIV. One of this immunomodulants is a human recombinant interferon (rHuIFN- α) registered to be used in HIV⁺ treatment. Easy oral application and low price are two advantages that make it a very interesting choice for both retroviral diseases.

The present work evaluates the effect of IFN- α in cats naturally infected with feline leukemia virus (FeLV) and feline immunodeficiency virus (FIV). The overall aim of this thesis was to analyze clinical and biopathological alterations and viral parameters and their evolution. This objective had the following three sub-objectives:

1. **To analyse the *in vitro* effect** of rHuIFN- α 2a, rHuIFN- α (A/D) and rFeIFN- ω on viral expression, reverse transcriptase activity (RT), viability, apoptosis, and viral RNA in feline lymphoid cell cultures infected with FeLV and FIV treated with these compounds.
2. **To study the clinical, analytical and viral initial situation** in a population of cats naturally infected with FeLV and FIV, to determine the alterations and significant correlations in both infections, and to have them as a reference value to develop sub-objective 3.
3. **To evaluate the evolution** of the clinical, analytical and viral infection in the group of cats orally treated with rHuIFN- α 2a (Roferon®).

In vitro studies have shown that the synthesis of viral proteins (assessed by the expression of p27 in FeLV and p24 in FIV) did not decrease with the three interferons used, but they produced a statistically significant decrease in the number of infective viral particles (assessed by the presence of reverse transcriptase, RT). The decrease in the RT values depended on the time of exposure and the concentration of IFN. These results suggested that IFN reduced the formation of viral particles in cells infected with FeLV or FIV at a post translational viral replication point: maturation, assembly and/or release of viral particles. The experiments confirmed that the viability of infected cells decreased with treatment: in FeLV-infected cells it was due to the development of apoptosis, and in FIV-infected cells was due to necrosis. Therefore, interferon treatment reduced the release of viral particles due to the alteration of cellular membranes by apoptosis and necrosis, decreased viral load and the spread of infection to other cells.

Once that IFN was shown to have an *in vitro* effect, the aim was to analyze the effect of rHuIFN- α 2a (Roferon®) in naturally FeLV- and FIV-infected cats. The study included 27 FeLV-infected cats (FeLV⁺) and 31 FIV-infected cats (FIV⁺), all of them part of a household at the time of study, even though they could initially have been stray cats. In both FeLV⁺ and FIV⁺ cats clinical signs were more severe in males than in females, though differences were not as pronounced as those observed depending on the age of the cats. Thus, the most represented age in FeLV⁺ cats was less than a year, and in FIV⁺ was three years. As expected, many nonspecific signs were observed, predominantly, loss of appetite, asthenia, oral lesions, pallor, and respiratory disorders. Each cat received a clinical score based on the clinical signs observed; no significant differences between FeLV⁺ and FIV⁺ cats were found.

For all these reasons, it has supposed that these clinical signs could be due to biopathological alterations, mainly in the red and white cells parameters. The analysis confirmed this suspicion, being anemia, neutropenia and leukopenia the most common disorders, although they could not be related to the clinical score. However, the FIV⁺ cats generally had only the neutrophil or lymphocyte counts altered, while 58.3% of the FeLV⁺ cats had altered both cell populations. This may indicate that FeLV infects the precursors in the bone marrow of the white cells, whereas FIV affects mature cells. Related to lymphocytes, a parameter that

clearly indicates the progress of infection, especially in FIV⁺ cats, is the CD4⁺/CD8⁺ ratio, because the main target cells of this virus are the CD4⁺ T-lymphocytes. It was observed that FIV⁺ cats with a higher clinical score had a lower CD4⁺/CD8⁺ ratio. This was also observed in the FeLV⁺ cats, but the values almost always remained between the normal range.

Hypergammaglobulinemia was another common abnormality; it was present in 40.7% of the FeLV⁺ cats, and in 80.6% of the FIV⁺ cats. In FeLV infection proteinogram alterations may be associated with secondary and opportunistic infections, as they were mainly observed in animals with clinical signs, whereas the hypergammaglobulinemia in FIV⁺ cats may be caused by the virus, as it was no significant differences between the cats with and without clinical signs were observed.

The virological situation can be evaluated through the concentration of viral proteins (p27 in FeLV or p24 in FIV), RT activity, and proviral load (by quantitative PCR). FIV⁺ cats had undetectable levels of p24 or RT activity, possibly due to the low number of circulating viral particles. In contrast, in FeLV⁺ cats RT activity was increased as related to disease severity ($p < 0.05$). All cats were positive for quantitative PCR, but no significant differences were observed with respect to the clinical condition.

The 58 cats included in the previous study were treated with 60 IU/day of Roferon® (rHuIFN- α) orally for four months, administered by the owners. The clinical status was assessed and samples were taken at mid-treatment, around month 2 (V1), at end of it, about month 4 (V2) and 8-12 months after the start of it (V3).

Three cats, who had presented a high clinical score before treatment, died during the treatment period. In the other cats an evident decrease of their clinical score was observed, and in many cases no clinical signs were scored after the administration of treatment. The anemic processes observed before treatment (V0) were reduced with the administration of Roferon®, at least in the mild or moderate processes. Neutrophil and lymphocytes counts increased transiently, so the percentage of cats with leucopenia, neutropenia and lymphopenia was reduced, increasing the number of cats with neutrophilia and lymphocytosis. This effect of IFN could imply a better response to secondary and opportunistic infections. Possibly related with this effect, an increase in the gammaglobulin concentration was detected during the study, and over 80% of FeLV⁺ and FIV⁺ cats showed hypergammaglobulinemia at some point during the time study.

In addition to these changes in the clinical status, parameters associated with the viral infection markedly improved with treatment: CD4⁺/CD8⁺ (which was the highest at the end of treatment in both infections), p27 concentration, RT activity and proviral load of FeLV⁺ cats (which reached the lowest values at the end of treatment). Regardless of the evident favorable evolution in the clinical, biopathological and virological situation assessed during the study, a worsening of all parameters analyzed during the V3, 4-8 months after treatment, was invariably observed. A modification of the treatment protocol is necessary in the future for a long-lasting benefit of the effect of interferon.

Briefly, oral administration of Roferon® is a therapeutic alternative that the veterinarians should consider in the treatment of FeLV⁺ and FIV⁺ cats, since it improves clinical, biopathological and virological parameters as demonstrated in the present study. The positive effects observed at the end of a treatment cycle with Roferon® were not maintained long. Thus, it would be necessary to extend the treatment period in order to consolidate this positive effect over time. Furthermore studies may be necessary to establish a protocol to ensure the maintenance of these positive effects over time, as well as the organic and viral impact that it may involve.

INTRODUCCIÓN

1.1. Generalidades de los retrovirus

Los virus de la leucemia felina (FeLV) y de la inmunodeficiencia felina (FIV) pertenecen a la familia *Retroviridae*. Los retrovirus están ampliamente distribuidos como agentes infecciosos de células de vertebrados, aunque también se han encontrado retrovirus que infectan a insectos y moluscos. Están asociados a gran variedad de enfermedades: tumores en diversas localizaciones, inmunodeficiencias y enfermedades autoinmunes, lesiones agudas en diferentes tejidos, etc. Sin embargo, algunos de ellos no son patógenos.

1.1.1. Clasificación

Los retrovirus se pueden clasificar según el modo de transmisión y virulencia en (Carrasco y Almendral, 2006):

- **Retrovirus exógenos:** pueden transmitirse horizontalmente entre individuos, bien por partículas libres extracelulares o bien por el contacto con células infectadas, o verticalmente al embrión. También es posible la transmisión al recién nacido por la leche o algún otro mecanismo perinatal.
- **Retrovirus endógenos:** secuencias de ADN retroviral que se introdujeron en el ADN celular de una célula germinal, transmitiéndose verticalmente de generación a generación. Son provirus que han perdido parte de la secuencia genética, siendo, por tanto, incompetentes para replicarse. Sin embargo, forman una “biblioteca génica” que permite a virus exógenos intercambiar información con ellos, mutar y dar lugar a formas víricas más patógenas.

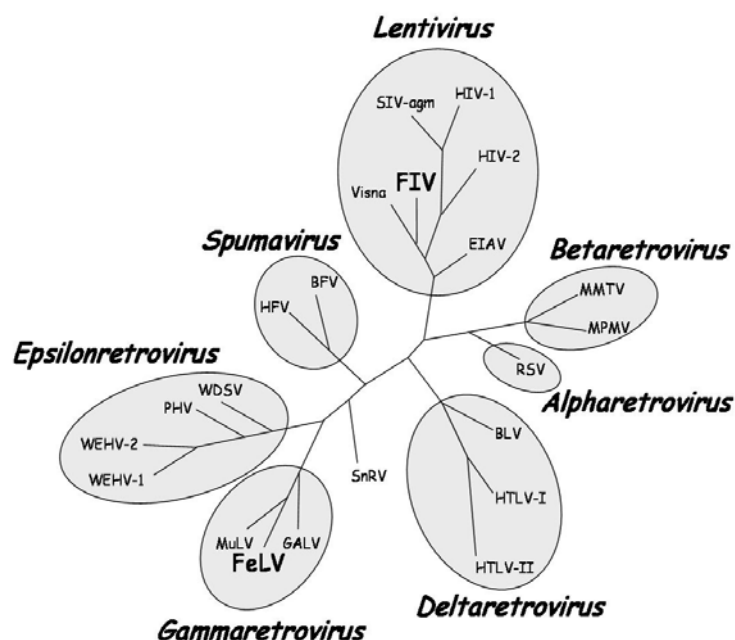


Figura 1.1.1. Relaciones filogenéticas de la familia *Retroviridae* (adaptado de Van Regenmortel y col., 2000).

La familia *Retroviridae* se divide en siete géneros: *Lentivirus* (en el que se incluye FIV), *Spumavirus*, *Alpharetrovirus*, *Betaretrovirus*, *Gammaretrovirus* (en el que está clasificado FeLV), *Deltaretrovirus*, *Gammaretrovirus* y *Epsilonretrovirus* (Murphy y col., 1999) (Figura 1.1.1.).

El virus de la leucemia felina y el virus de la inmunodeficiencia felina son los retrovirus patógenos que son transmitidos exógenamente (Dunham y Graham, 2008; Lutz y col., 2009; Gil y col., 2012). El virus espumoso felino, aunque transmisible, es considerado no patogénico, y se ha demostrado que no existe correlación entre la presencia de anticuerpos del virus y enfermedad clínica (Romen y col., 2006)

1.1.2. Estructura genética y proteínas

Las partículas retrovirales están formadas por:

- **Envoltura:** Tiene su origen en la bicapa lipídica de la membrana celular, en la que se incluyen dos glucoproteínas de origen vírico, SU (superficie) y TM (transmembrana), que forman proyecciones poco definidas de 8 nm alrededor de toda la envoltura. TM tiene la función de unir SU a la envoltura celular.
- **Matriz:** Formada por la proteína MA, confiere estabilidad a la partícula vírica.
- **Core o Cápsida:** Formada en su mayoría por las proteínas de la cápsida (CA), en cuyo interior, rodeado de las proteínas de la nucleocápsida (NC), se alojan el ARN y las proteínas con acción enzimática: proteasa (PR), retrotranscriptasa (RT) e integrasa (IN). En algunos virus se encuentra la enzima dUTPasa (DU).

Los viriones poseen dos cadenas sencillas de ARN (Dunham y Graham, 2008). Los virus infecciosos poseen tres genes para codificar sus proteínas. En orden 5'→3' son: *gag-pol-env*; en el extremo 5' tiene una estructura "cap" y en el extremo 3' una cola poli adenilada o poli(A) (Dunham y Graham, 2008; Hosie y col., 2009).

- **Gen *gag*:** posee la información necesaria para codificar las proteínas estructurales internas del virus (MA, CA, NC y otras proteínas específicas de algunos virus con función indeterminada).
- **Gen *pol*** (polimerasa): codifica las proteínas con actividad enzimática (PR, IN, RT y, en algunos virus, DU), necesarias para la replicación vírica.
- **Gen *env*** (envoltura): codifica las proteínas que se insertan en la envoltura y que constituyen los peplómeros (SU y TM).
- Algunos retrovirus poseen genes que codifican proteínas no estructurales importantes para la regulación de la expresión, la replicación vírica, la patogénesis, etc.

Una de las características más constantes de los retrovirus a nivel genómico es el alto ritmo de mutación, debido a que la retrotranscriptasa (RT) carece de función exonucleasa (reparadora) y tiene una alta frecuencia de error en la incorporación de nucleótidos. Además pueden producirse recombinaciones con otros genomas (Dunham y Graham, 2008), lo que es especialmente importante en lentivirus como el de la inmunodeficiencia humana (HIV) o FIV. En FIV se ha estimado que el grado de mutación del gen *env* es de $3,4 \times 10^{-3}$ sustituciones nucleotídicas por base y por año, y en los genes *gag* y *pol* de menos de 10^{-4} sustituciones nucleotídicas por año, similar a los valores hallados para HIV-1 (Greene, 1993).

Otra característica de los retrovirus es que la secuencia del provirus (genoma retroviral insertado en el genoma celular en forma de ADN bicatenario) es más larga que la secuencia del genoma ARN del virus. Esto es debido a que la secuencia del provirus se encuentra flanqueada por las repeticiones terminales largas (LTRs) en cada uno de los extremos, que poseen la información necesaria para el inicio y la terminación de la expresión génica.

1.1.3. Infección y replicación vírica

En primer lugar se produce la unión de la proteína vírica con el receptor de la célula a infectar que permite que el virus penetre en la célula. En el citoplasma el ARN vírico es liberado y, mediante la acción de la enzima RT vírica, se crea a partir de la cadena simple de ARN una cadena doble de ADN. Esta doble cadena penetra en el núcleo celular y mediante la acción de la Integrasa se incorpora a la molécula de ADN de la propia célula. Esta secuencia vírica integrada en el ADN celular se conoce como "provirus".

Este provirus sirve como molde para la producción tanto de ARNm, el cual es traducido en proteínas, como de ARN vírico (genómico). Una vez formadas las poliproteínas, el ensamblaje se produce bajo la membrana celular, y se liberan los viriones por gemación (Figura 1.1.2.).

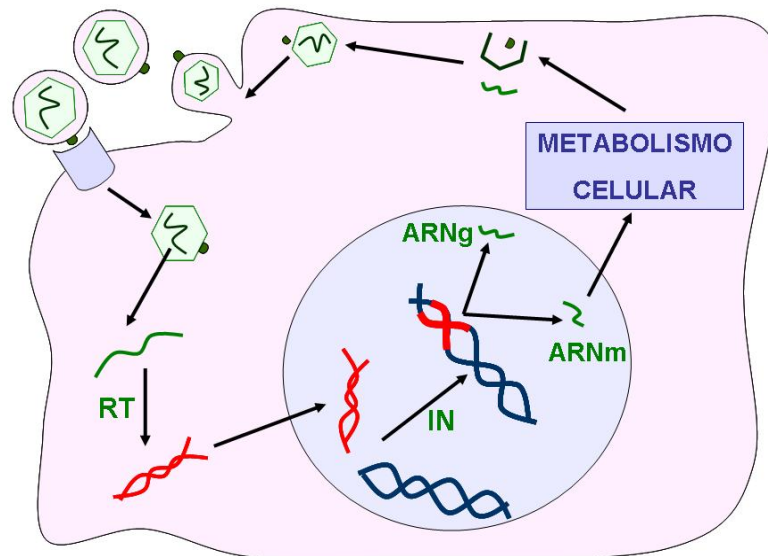


Figura 1.1.2. Esquema del ciclo de replicación de la Familia *Retroviridae*. RT, transcriptasa inversa; IN, integrasa; ARNg, ARN vírico genómico; ARNm, ARN mensajero para la síntesis de nuevas proteínas víricas.

Cuando la célula con el provirus ya integrado se divide, las células hijas reciben, junto al material genético propio de la célula, el ADN del virus integrado, de modo que la infección se mantiene de forma constante y sólo puede eliminarse si se destruyen todas las células que tienen el provirus. Este hecho hace muy complicado los tratamientos frente a las infecciones por retrovirus, ya que no sólo tienen que ir dirigidos a restringir la formación de partículas víricas infectivas y evitar nuevas infecciones, sino también a destruir las células ya infectadas (Torres y col., 2005; Hofmann-Lehmann y col., 2008; Willet y Hosie, 2013).

Son virus no citopáticos y escapan de la célula que infectan gemando por la membrana celular (Hartmann, 2008)

1.2. Leucemia Felina

1.2.1. Etiología

1.2.1.1. Virus de la Leucemia Felina (FeLV)

El virus de la leucemia felina (FeLV) es un retrovirus del género Gammaretrovirus (Lutz y col., 2009). Fue aislado por primera vez en Escocia de un gato que había desarrollado linfoma, y que vivía con un grupo de gatos que presentaban el mismo proceso (Jarrett y col., 1964 a y b).

Sobre la base de similitudes en secuencias de nucleótidos, se determinó que FeLV evolucionó a partir de un virus de la leucemia murina en un antepasado de la rata, posiblemente en el desierto de África del Norte hace 10 millones de años. Esta transmisión se produjo posiblemente por la ingestión o mordedura de una rata infectada (Benveniste y col., 1975).

Los viriones, de 105-125 nm con escasas proyecciones en la superficie; son partículas de tipo C (es decir, las partículas víricas no se observan antes de la gemación). La cápsida es de simetría icosaédrica, se encuentra condensada y centrada (Figura 1.2.1.)

Los genes y proteínas del virus se resumen en la Tabla 1.2.1. (Lutz y col., 2009)

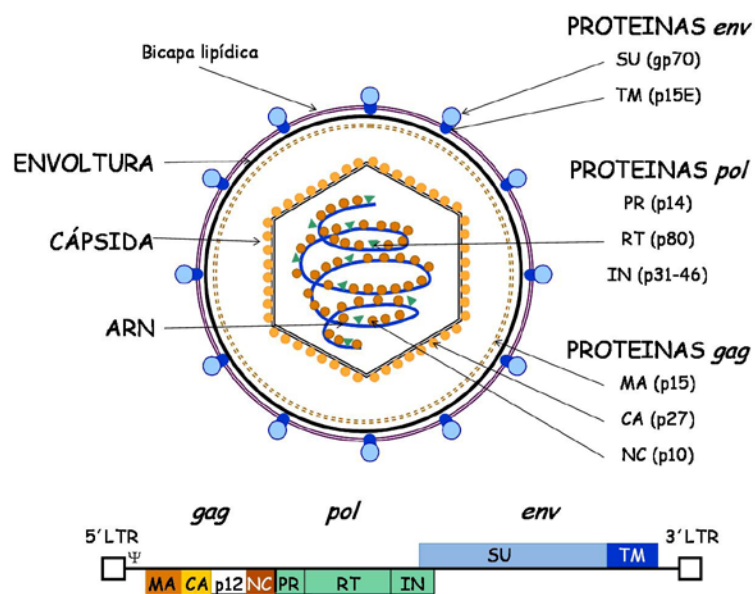
Tabla 1.2.1. Genes y proteínas del virus de la leucemia felina (FeLV)

Gen	Nombre-función		Nombre de la proteína
<i>env</i>	SU	Superficie	gp70
	TM	Transmembrana	p15E
<i>gag</i>	MA	Matriz	p15
	CA	Cápsida	p27
	p12	Desconocida	p12
	NC	Nucleocápsida	p10
<i>pol</i>	PR	Proteasa	p14
	IN	Integrasa	p46
	RT	Transcriptasa inversa	p80

Las proteínas de la envoltura (gp70 y p15E) están relacionadas con los procesos de unión al receptor celular, penetración y formación de sincitios; debido a su situación externa, son las primeras en ser reconocidas por el sistema inmunitario, induciendo anticuerpos neutralizantes. La glucoproteína gp70 en un subgrupo específico de FeLV, FeLV-T, está relacionada con procesos de inmunodeficiencia por su tropismo por los receptores de linfocitos T (Lauring y col., 2001). De igual modo, p15E parece estar también relacionada con procesos de inmunosupresión (Lafrado y col., 1987; Langhammer y col., 2005 y 2006).

La detección de la proteína de la cápsida (p27) es utilizada en muchos de los tests diagnósticos como indicativo de la infección vírica, porque se produce en exceso y es la más abundante. Las proteínas internas, al igual que las de superficie, son muy inmunógenas, pero los anticuerpos que se forman no son neutralizantes (Gómez-Lucía y col., 2006; Dunham y Graham, 2008; Levy y col., 2008a; Lutz y col., 2009; Little y col., 2011; Willet y Hosie, 2013).

Una proteína no vírica que se detecta en la infección por FeLV es el antígeno FOCMA (*Feline Oncornavirus Cell Membrane Antigen*). En algunos gatos esta proteína se expresa en la superficie de los linfocitos B o T infectados y malignizados (linfoma). El sistema inmunitario es capaz de reconocer esta proteína, formar anticuerpos protectores y destruir las células que lo expresan, disminuyendo así la probabilidad de desarrollar tumores de linfocitos, pero no otros cuadros relacionados con la enfermedad (Doménech y col., 2006).

**Figura 1.2.1.** Esquema de una partícula y del genoma proviral de FeLV.

1.2.1.2. Clasificación de FeLV

FeLV engloba una serie de virus, tanto exógenos como endógenos. Los FeLV exógenos se clasifican en tres subgrupos (FeLV-A, -B, y -C) en función de su gp70, que define la capacidad para infectar células de gato o de otras especies, así como el receptor que emplea para introducirse en la célula (Dunham y Graham, 2008; Willet y Hosie, 2013).

- **FeLV-A:** Se replica exclusivamente en células de gato (ecotrópico), y está presente en todos los animales infectados (Dunham y Graham, 2008), sólo o en combinación con B y/o C (lo que lo convierte en más patogénico). Es el responsable de la transmisión del virus entre individuos (Willet y Hosie, 2013). Está fuertemente asociado a las enfermedades (tanto proliferativas como no proliferativas) de gatos domésticos infectados por FeLV (Chen y col., 1998) siendo la gp70 de FeLV-A mucho más estable antigénicamente que la de los subgrupos B y C. El virus penetra en la célula a través del transportador de tiamina 1 (THTR1) (Mendoza y col., 2006; Dunham y Graham, 2008; Willet y Hosie, 2013).

Una variante específica de FeLV-A, con una mutación en el gen *env* que le impide replicarse y debe asociarse siempre a FeLV-A, denominada FeLV-FAIDS (*Feline Acquired ImmunoDeficiency Syndrome*) se ha demostrado que induce un síndrome de inmunodeficiencia mortal en el 100% de los gatos SPF a los que se inocula (Poss y col., 1989)

- **FeLV-B:** Es capaz de infectar y replicarse en células de diferentes especies (Roy-Burman, 1995; Murphy y col., 1999). Su origen más probable es la recombinación total o parcial del gen *env* de FeLV-A y secuencias endógenas (Willet y Hosie, 2013). En esta recombinación perderían la capacidad replicativa (Tailor y Kabat, 1997). Parece penetrar en las células por receptores relacionados con la familia de moléculas transportadoras de fosfato, Pit 1 y Pit 2 (Anderson y col., 2001; Willet y Hosie, 2013).
- **FeLV-C:** Al igual que FeLV-B puede infectar células de diferentes especies (Roy-Burman, 1995; Murphy y col., 1999). Aunque no está comprobado, parece que se formó a partir de mutaciones de FeLV-A en el dominio de unión al receptor (Stewart y col., 2012; Willet y Hosie, 2013). Tampoco este virus tiene capacidad replicativa. Su prevalencia es baja, menos de un 1% de los gatos infectados. FeLV-C se une a un transportador aniónico de los eritroblastos (FLVCR1) y de otras células implicadas en la estimulación de la hematopoyesis a través de citoquinas, como los macrófagos (Tailor y col., 1999; Quigley y col., 2000).

Aunque FeLV-A por sí sólo es capaz de producir enfermedad (Chen y col., 1998), su asociación con otros subgrupos o variantes, aumentan la patogenicidad del mismo. Por ejemplo, FeLV-FAIDS induce síndrome de inmunodeficiencia (Poss y col., 1989), junto con FeLV-B se relaciona con el desarrollo de linfomas y neuropatogenia, y junto con FeLV-C induce anemia aplásica (Mathes y col., 1994; Dunham y Graham, 2008; Willet y Hosie, 2013), posiblemente por su tropismo por células que participan en la hematopoyesis.

Algunos autores consideran un cuarto subgrupo de FeLV, FeLV-T, de marcado carácter T-linfotrópico, y que surge en gatos infectados con un clon avirulento transmisible de FeLV. Las propiedades citopáticas y patogénicas de FeLV-T resultan de la adquisición de mutaciones en la proteína SU. FeLV-T necesita tanto el receptor clásico Pit1 como un segundo co-receptor o factor de entrada. Este segundo receptor, denominado FeLIX (proteína FeLV "X-esoria"), parece ser una proteína endógena similar a un fragmento de las moléculas de la envoltura de FeLV, y de hecho, parece proceder de las secuencias retrovirales endógenas felinas. Esta proteína celular puede funcionar tanto como proteína transmembrana como componente soluble para facilitar la infección (Anderson y col., 2000; Luring y col., 2001).

Además, el virus del sarcoma felino es una recombinación del genoma de FeLV-A con genes celulares asociados con cáncer (protooncogenes) y se genera *de novo* en gatos infectados con FeLV-A (Hartmann, 2008).

Los retrovirus endógenos felinos (FERV) parecen tener su origen en los virus FeLV, por lo que se conocen como enFeLV. Su genoma es incapaz por sí mismo de replicarse, ya que es defectivo, pero pueden heredarse y en caso de infección de FeLV-A, recombinarse con él, aumentando la patogenicidad (Cotter y col., 1998).

FeLV-A y -B son policitotrópicos, es decir, tienen capacidad para replicarse en diferentes células sanguíneas, principalmente en linfocitos B y monocitos. Cuando el virus entra en la médula ósea infecta a los precursores sanguíneos, que darán lugar a células maduras con el provirus integrado. El virus también puede replicarse en tejidos como las glándulas salivares y la vejiga de la orina, liberando virus con capacidad infectiva en la saliva y la orina (Rojko y Kociba, 1991; Norsworthy, 1993).

1.2.2. Epidemiología

1.2.2.1. Distribución y prevalencia

FeLV infecta principalmente a gatos domésticos, pero también a otros pequeños felinos salvajes, como *Felis silvestris*, así como linceos europeos e ibéricos (Luaces y col., 2008; Lutz y col., 2009). Aunque principalmente afecta a gatos domésticos (Hartmann, 2008). Su distribución es mundial, con prevalencias bastante similares en las diferentes regiones geográficas, oscilando entre 1-8% en gatos sanos (Levy, 2000; Hartmann, 2008) y hasta un 21% en gatos con alguna patología compatible (Rupérez y col., 2006). Los estudios de prevalencia en España son escasos, pero parecen indicar que es más alta que en la mayoría de los países de nuestro entorno, alcanzando hasta un 30,4 % en gatos con signos clínicos (Arjona y col., 2000).

A pesar de estos importantes porcentajes de prevalencia, la infección en Europa se ha reducido paulatinamente, gracias a los test diagnósticos, los programas de prevención, la vacunación y el mejor conocimiento de la enfermedad (Lutz y col., 2009).

1.2.2.2. Fuentes de infección y transmisión

La saliva es la principal fuente de infección de la enfermedad. Los gatos víremicos con o sin signos clínicos eliminan a través de ella partículas víricas de forma constante, alcanzando concentraciones que superan a la del plasma (Hartmann, 2008; Dunham y Graham, 2008). El acicalamiento mutuo, las mordeduras, compartir los platos de alimento y de agua son elementos de riesgo que facilitan la transmisión del FeLV (Hoover y col., 1977; Lutz y col., 2009). Aunque otras secreciones pueden ser infectantes (orina, heces, secreciones respiratorias, semen, fluidos vaginales, leche o sangre) la probabilidad de contagio es muy inferior (Hartmann, 2008; Lutz y col., 2009).

Las gatas víremicas pueden transmitir la infección verticalmente a los cachorros a través de la placenta. En un 80% de los casos se produce reabsorción embrionaria, aborto o el nacimiento de cachorros con atrofia del timo que provocará su muerte; el 20% restante, a pesar de sobrevivir, desarrollan viremia persistente (Hoover y Mullins, 1991; Lutz y col., 2009).

En todos los casos es necesario un contacto muy estrecho y prolongado, ya que el virus es muy lábil en el medio ambiente, siendo sensible a la luz ultravioleta, calor, detergentes y sequedad. Por tanto, la transmisión horizontal indirecta es prácticamente imposible.

1.2.2.3. Factores que influyen en la transmisión del virus

Los factores que influyen en la transmisión de FeLV son:

- Edad: los gatos jóvenes son más susceptibles, siendo difícil infectar experimentalmente gatos mayores de 16 semanas. Una explicación a este hecho podría ser que la cantidad de receptores celulares necesarios para que FeLV ingrese en las células parece disminuir en gatos mayores o debido a una maduración de los macrófagos (Hoover y Mullins, 1991; Lutz y col., 2009; Hartmann, 2012).

- Hábitos sociales: la infección está relacionada con la densidad de población y el modo de vida de los animales, asociándose así con el vagabundeo (Guiot y Poulet, 1999).

FelV es considerado el “retrovirus de los gatos amigos”, debido a que el contagio se suele producir entre individuos que conviven habitualmente (Rupérez y col., 2006). Por ello, en algunos países Europeos, Estados Unidos y Canadá, la prevalencia de la enfermedad en gatos que viven aislados en una casa es inferior al 1%, mientras que aquellos que viven en colectividades sin medidas de control pueden superar el 20% (Lutz y col., 2009).

- Sexo: Debido a que se suele transmitir mediante contactos sociales, la infección es igual de frecuente en machos y hembras. Sin embargo, la probabilidad de infectarse es 1,5 a 2 veces superior en machos que en hembras, lo que parece estar relacionado con las hormonas sexuales (Arjona y col., 2000; Tejerizo y col., 2005), o con su mayor comportamiento deambulatorio (Lee y col., 2002).
- Raza: aunque no hay una predisposición racial, la infección es menos frecuente en gatos de razas puras (Hartmann, 2008).

1.2.3. Patogenia

El resultado de la infección por FelV va a depender de diferentes factores como la edad, el estado inmunitario del gato, la patogenicidad del virus, la duración de la exposición y la carga vírica infectiva (Figura 1.2.2.) (Levy y col., 2008; Willet y Hosie, 2013).

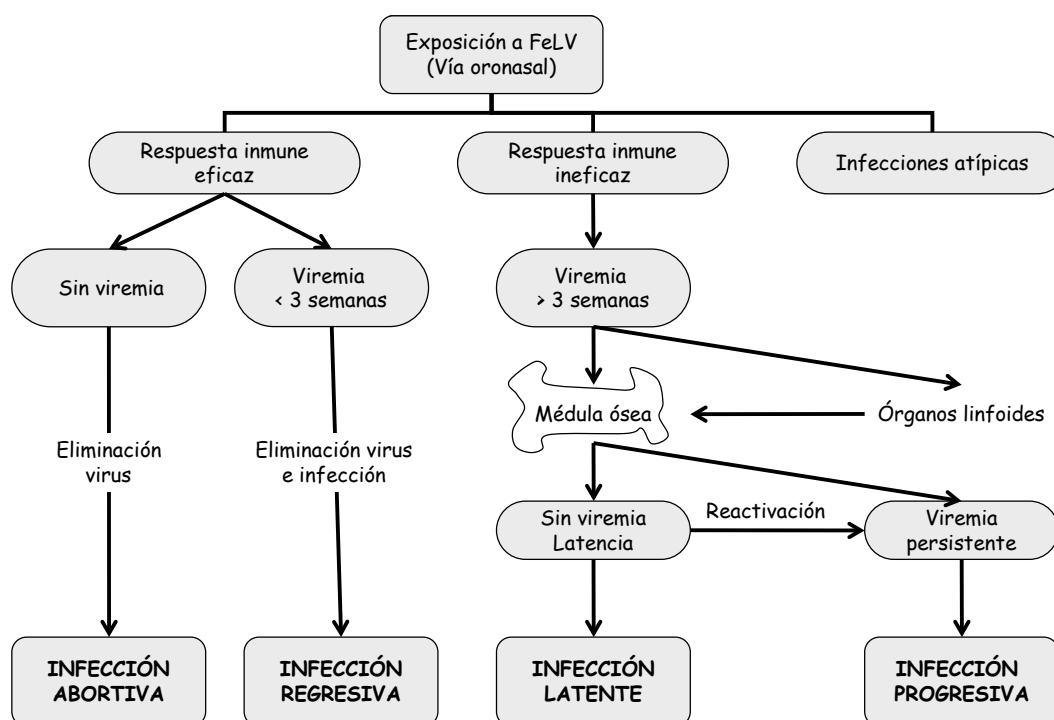


Figura 1.2.2. Esquema de la patogenia de la leucemia felina.

1.2.3.1. Evolución de la infección

Tras la infección inicial, principalmente por vía oronasal, el virus se replica en el tejido linfóide regional. Estudios recientes y la aplicación de técnicas moleculares, como la PCR cuantitativa que determina la carga vírica en los gatos infectados, han permitido caracterizar diferentes evoluciones de la enfermedad dependiendo de la respuesta inmunitaria que se desarrolla (Torres y col., 2005; Dunham y Graham, 2008; Levy y col., 2008; Hartmann, 2012; Willet y Hosie, 2013).

- **Respuesta inmunitaria eficiente:** ocurre en un 60% de las infecciones. El virus es eliminado completamente del organismo (Hofmann-Lehmann y col., 2001; Hartmann, 2008; Lutz y col., 2009; Willet y Hosie, 2013).
 - a. **Infección abortiva:** la respuesta tanto celular (principalmente) como humoral es lo suficientemente fuerte y rápida para que la infección quede limitada a la cavidad oronasal y el virus nunca alcance el torrente circulatorio (Torres y col., 2005; Dunham y Graham, 2008; Levy y col., 2008a).
 - b. **Infección regresiva:** se produce una fase de viremia inicial pero el sistema inmunitario desencadena una respuesta eficiente antes de que el virus alcance la médula ósea o los órganos linfoides. Esta inmunidad protege de futuras reinfecciones (Flynn y col., 2002 a y b; Torres y col., 2005; Lutz y col., 2009; Willet y Hosie, 2013).
- **Respuesta inmunitaria ineficiente:** en el caso de que la respuesta inmunitaria no sea suficiente o se produzca demasiado tarde, el virus penetra en la médula ósea, ganglios, nódulos linfáticos y/o timo. Las células madre hematopoyéticas se infectan y originan granulocitos y plaquetas infectadas; a partir de este momento la eliminación total de la infección parece improbable (Dunham y Graham, 2008). En estos casos se encuentran títulos víricos muy altos en sangre y en saliva que se mantienen hasta que haya una respuesta inmunitaria adecuada (Gomes-Keller y col., 2006a). Por tanto, pueden producirse las siguientes posibilidades:
 - a. **Infección progresiva:** si la respuesta inmunitaria falla o no es lo bastante fuerte, el virus seguirá circulando libre o asociado a células y se diseminará por todo el organismo, produciéndose viremia persistente; es signo de un mal pronóstico y en un 90% de los casos provocará la muerte del animal en dos o tres años (Torres y col., 2005). Si la viremia persiste más de 16 semanas, existen probabilidades muy altas de que el animal permanezca persistentemente virémico e infeccioso para otros gatos durante el resto de su vida (Hartmann, 2008).
 - b. **Infección latente:** la respuesta inmunitaria llega a ser efectiva y la médula no libera ni virus ni células infectivas. Durante esta etapa los gatos están aparentemente sanos. Este estado puede permanecer durante muchos años pero puede reactivarse espontáneamente o por cualquier circunstancia que induzca inmunosupresión (uso prolongado de glucocorticoides, estrés, gestación, otras infecciones, etc.), dando lugar a una infección progresiva (Torres y col., 2005; Lutz y col., 2009; Willet y Hosie, 2013). La probabilidad de revertir la latencia y que se produzca viremia se reduce con el paso del tiempo (Pedersen y col., 1984; Hayes y col., 1992; Hofmann-Lehmann, 2001; Hartmann, 2012).

Para la mayoría de los procesos clínicos que produce FeLV es necesario la replicación vírica activa. Sin embargo, como el provirus puede insertarse en muchos sitios diferentes en el genoma felino puede alterar, interrumpir o inactivar genes y alterar su expresión dando lugar a anomalías mielosupresoras y tumores (Hartmann, 2008).

En algunos casos (5-10%) se producen **infecciones atípicas**, entre las que se incluyen aquéllas en las que el virus se replica en lugares diferentes a la médula ósea y las que desarrollan un cuadro de inmunodeficiencia similar al de FIV (Hartmann, 2008 y 2012).

- **Replicación local:** Ante una respuesta parcialmente eficaz el virus queda secuestrado en diferentes tejidos (vejiga de la orina, ojos, glándula mamaria), liberándose de forma alternante o constante a la circulación sanguínea. Es posible que estos gatos presenten resultados discordantes o débilmente positivos en pruebas de antígeno, o es posible que se alternen los resultados positivos y negativos (Hoover y Mullins, 1991; Rojko y Hardy, 1994; Levy y col., 2008). Las gatas con infección atípica de las glándulas mamarias pueden transmitir el virus a la progenie mediante la leche materna y presentar un resultado negativo a las pruebas de diagnóstico.

- **Síndrome de inmunodeficiencia adquirida por FeLV (FAIDS):** La infección combinada de FeLV-A y FeLV-T da lugar a este cuadro de inmunosupresión (Goto y col., 2000) con una diseminación vírica masiva e infección de linfocitos T y B, lo que compromete la respuesta inmunitaria.

1.2.3.2. Respuesta inmunitaria

Normalmente, la respuesta inmunitaria humoral se desarrolla en las primeras semanas (4^a-8^a) post infección (p.i.) tras el pico de viremia aunque, en ocasiones, el exceso de p27 produce un mecanismo de anergia inmunológica que impide el desarrollo de esta respuesta y que contribuye a la persistencia del virus (Jarret, 1999). La formación de anticuerpos se produce de forma ordenada. En primer lugar se forman anticuerpos frente a las glucoproteínas más externas (principalmente gp70) que son neutralizantes, e impiden que el virus penetre en la célula. A continuación surgen anticuerpos frente a otras proteínas de la cápsida (principalmente p27), transmembrana y RT (Hartmann, 2008 y 2012; Sellon y Hartmann, 2008).

La respuesta humoral sólo será eficaz si evita que el virus invada la médula ósea u otros órganos. Si esto es así, esta inmunidad protegerá además de futuras reinfecciones e incluso se transmitirá vía calostroal a los cachorros (Hartmann, 2008; Sellon y Hartmann, 2008).

Los anticuerpos anti-FOCMA tienen un papel importante en la patogenia relacionada con tumores, ya que identifican las células neoplásicas que se lisan a través del complemento (Rojko y Hardy, 1994).

La respuesta inmunitaria celular a través de los linfocitos T CD8⁺ es previa a la respuesta humoral (1^a-2^a semana) p.i. (Flynn y col., 2002a y b) y en algunos animales es capaz de eliminar completamente el virus. La inmadurez de la respuesta celular podría explicar la mayor susceptibilidad de los gatos en su primer año de vida.

En la infección por FeLV también se produce una alteración en la red de citoquinas, aunque su papel en la patogenia es controvertido. Se han descrito en algunos gatos el incremento de TNF α y la disminución de IL-2 y IL-4, sin que esté claro cómo varían los niveles de IFN γ (Hartmann, 2008).

En las fases finales de la infección por FeLV hay una gran predisposición a infecciones secundarias, debido a que se desarrolla inmunodeficiencia. El mecanismo exacto por el que FeLV daña al sistema inmunitario no se conoce bien, aunque se ha asociado a la infección de plaquetas y neutrófilos en gatos con viremia persistente (Doménech y col., 2006). El subgrupo FeLV-T puede producir una marcada inmunosupresión por la infección y disminución de linfocitos T, denominada Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida Felina asociada a FeLV (FeLV-FAIDS) (Hardy y Essex, 1986) o SIDA felino. Algunos de los posibles mecanismos que desembocan en este síndrome son la inducción de la apoptosis de linfocitos y neutrófilos (Rojko y col., 1992), la unión de superantígenos al receptor de los linfocitos T (Janeway, 1990), las alteraciones en el complemento y citoquinas (Grant y col., 1979), o la formación de inmunocomplejos, que impiden el reconocimiento y la unión de los anticuerpos a los antígenos víricos.

En gatos jóvenes se pueden presentar inmunodeficiencias por atrofia tímica, debida a una depleción linfóide del timo a consecuencia de la replicación rápida de FeLV (Hardy y Essex, 1986).

1.2.4. Cuadro clínico

Al inicio de la infección es común que los gatos no exhiban todos los signos clínicos que se describen a continuación, pero con el tiempo existe un deterioro progresivo que da lugar a toda una variedad de signos clínicos de diversa consideración que pueden alternarse con periodos asintomáticos (Hartmann, 2012). Además de los signos clínicos inespecíficos y frecuentes (decaimiento, fiebre, falta de apetito) aparecen una serie de alteraciones biopatológicas y clínicas más específicas. A pesar de que el virus se denominó de este modo por la neoplasia contagiosa que llamó la atención en primer lugar, la mayoría de los gatos infectados se presentan al veterinario por anemia o supresión inmunológica. No se conocen claramente los mecanismos por los que aparecen esta variedad de signos clínicos dentro de los gatos virémicos.

1.2.4.1. Linfomas, leucemias y enfermedades mieloproliferativas

Los tumores más frecuentes en la infección por FeLV son los linfomas malignos y leucemia, y con menor frecuencia otros tumores hematopoyéticos, osteocondromas y neuroblastoma olfatorio (Lott-Stolz, 1988; Schrenzel y col., 1990; Hartmann, 2008 y 2012).

El mecanismo por el cual se producen los linfomas y las leucemias no se conoce en su totalidad. La teoría más factible es que tras su inserción, los factores de transcripción situados en el LTR favorecen la expresión de oncogenes celulares (*myc* y *fit-1*), aumentando de este modo la proliferación celular (Fujino y col., 2008). También es posible que FeLV incorpore el oncogen celular formando un virus recombinante, que si infecta a una nueva célula es capaz de expresar por sí mismo el oncogen incorporado sin necesidad de utilizar uno celular (Hartmann, 2008).

Las células infectadas pueden expresar en su superficie proteínas virales (FOCMA) frente a las cuales el gato es capaz, en algunas ocasiones, de crear anticuerpos. Aunque hay opiniones controvertidas, algunos autores señalan que estos anticuerpos pueden tener carácter neutralizante (Essex y col., 1971; Vedbrat y col., 1983; Hartmann, 2008).

En los años 90, se consideró que el 70% de los gatos con linfomas y entre el 70 y el 90% de los gatos con enfermedades mieloproliferativas eran positivos a FeLV. Sin embargo, el control de la enfermedad ha reducido significativamente este porcentaje entre el 8 y 20% (Hartmann y col., 1998; Dunham y Graham, 2008; Hartmann, 2008; Teske y col., 2002).

Los siguientes factores pueden influir en el desarrollo de tumores (Rojko y Hardy, 1994):

- Edad: los gatos jóvenes tienen un periodo pretumoral más corto.
- Raza: algunas razas puras, como los siameses, tienen más predisposición a sufrir linfosarcomas (Court y col., 1997).
- Subgrupo: FeLV-A puede recombinarse con secuencias endógenas, dando lugar a variantes víricas más leucémicas.
- Enfermedades asociadas: la presencia de otras enfermedades acorta el periodo de aparición de las leucemias (Kociba y col., 1995).

Los linfomas pueden afectar a diferentes órganos y clasificarse según su ubicación en multicéntricos, alimentarios (intestinales), mediastínicos (tímicos) y atípicos o extranodales (Lutz y col., 2009). El linfoma mediastínico era el observado con mayor frecuencia, principalmente en gatos menores de 3 años, pero su frecuencia parece haber disminuido con el tiempo (Teske y col., 2002). La disnea es el signo clínico más importante asociado a este linfoma. El linfoma alimentario afecta a estómago, intestino y ganglios mesentéricos, causando en mayor o menor medida anorexia, pérdida de peso, vómitos y diarreas. Afecta principalmente a gatos mayores, siendo la prevalencia de FeLV en gatos con estos linfomas del 25-30% (Mahony y col., 1995; Cotter, 1998; Dunham y Graham, 2008). El linfoma multicéntrico afecta a diferentes órganos; se calcula que aproximadamente la mitad de los gatos con este linfoma son positivos a FeLV (Hartmann, 2008).

La mitad de las leucemias no linfoides están asociadas o se detectan en gatos positivos a FeLV. Todas las líneas celulares hematopoyéticas son susceptibles de desarrollar una enfermedad mieloproliferativa como consecuencia de la infección por FeLV. FeLV-C está asociado a la mielosis eritrémica, provocando una anemia no regenerativa y un hematocrito por debajo del 15%. En el síndrome mielodisplásico la médula ósea se llena de células blásticas y se suprime la hematopoyesis normal (Hisasue y col., 2001). Con frecuencia se presenta hepatomegalia con ictericia y esplenomegalia, debido a la infiltración maligna o hematopoyesis extracelular. Los estudios citológicos o de médula ósea muestran un aumento de la celularidad, maduración megaloblástica, aumento de la mielofibrosis y blastocitos inmaduros. Las leucemias pueden afectar a las series mieloide (leucemia granulocítica y eosinofílica), eritroide (eritroleucemia), plaquetaria (leucemia megacariocítica), endotelial (reticuloendoteliosis) o a todas ellas a la vez (policitemia *rubra vera*). Estas células

malignas pueden quedar secuestradas en la médula ósea (aleucémicas) o salir al torrente circulatorio (leucémicas).

Entre las neoplasias hematopoyéticas las más frecuentes son los fibrosarcomas. En los fibrosarcomas, FeLV se asocia con el virus del sarcoma felino (FeSV), un recombinante de FeLV-A con oncogenes celulares (*fes*, *fms* o *fgr*). Suele aparecer en gatos jóvenes y da lugar a cuadros multicéntricos de crecimiento rápido, invasivo y metastásico. Las cepas de FeSV son defectuosas y necesitan a FeLV para que le proporcione algunas proteínas (como las que codifica el gen *env*). Las células de los fibrosarcomas expresan FOCMA al igual que las de linfomas (Lutz y col., 2009; Hartmann, 2012).

En las mielofibrosis surge una proliferación fibroblástica, que puede llegar a obliterar la cavidad medular ósea, impidiendo la formación de células sanguíneas.

1.2.4.2. Síndrome de supresión de la médula ósea

Los trastornos hemáticos, como consecuencia de la supresión de la médula ósea, son un hallazgo común en gatos infectados por FeLV. El síndrome de supresión puede afectar a todas las líneas celulares hematopoyéticas. Aunque es necesario que exista una replicación viral para que aparezcan estos trastornos, en algunos casos el provirus puede interrumpir o inactivar genes celulares y desarrollarse la mielosupresión en infecciones latentes. También puede producirse la inmunosupresión por un cambio en el microambiente medular por la infecciones de los fibroblastos del estroma o por la expresión de antígenos de superficie que induzcan su destrucción inmunitaria.

La anemia es la principal alteración clínica patológica en gatos infectados por FeLV. La mayoría de anemias asociadas a FeLV son no regenerativas y están causadas por el efecto supresor del virus sobre la médula ósea, tanto de los precursores hematopoyéticos como de las células del estroma (Lutz y col., 2009; Hartmann, 2012). En estos casos se presentan normocitosis o macrocitosis sin evidencia de respuesta de reticulocitos. En general, se asocia con médula normocelular, aunque se puede encontrar hipocelularidad con un aumento de proporción mieloide-eritroide (Levy, 2000). Además, la anemia no regenerativa puede estar provocada por la infección sistémica, infecciones secundarias o el estrés. Conocida como anemia de enfermedad crónica, es una anemia leve (hematocrito entre el 20 y el 30%) que mejora cuando el proceso subyacente se trata con éxito.

Aproximadamente el 10% de las anemias son regenerativas, caracterizadas por reticulocitosis, macrocitosis, policromatofilia, anisocitosis y eritrocitos nucleados (eritroblastos) de origen extramedular (hígado y bazo) (Mackey y col., 1975; Kociba y Halper, 1987). Pueden deberse a una hemólisis inmunomediada por el desarrollo de anticuerpos contra antígenos de membrana eritroide (Chen y Essex, 1984; Lutz y col., 2009), hemólisis por coinfecciones con *Haemobartonella haemofelis*, *Ehrlichia* o virus de la peritonitis infecciosa felina (Hartmann, 2012), a hemorragias por trombocitopenias (Hartmann, 2008) o principalmente asociado a una infección de FeLV-C (Dunham y Graham, 2008). El receptor de FeLV-C es una proteína exportadora de hemoglobina; la unión del virus al receptor deriva en la acumulación de hemoglobina en los progenitores celulares que provocan su muerte y, por tanto, la reducción de la serie eritrocitaria (Quigley y col., 2000 y 2004).

La aplasia pura de eritrocitos está relacionada con FeLV-C. La interacción del virus y el receptor del eritrocito bloquean la diferenciación de los progenitores eritroides, mediante la interferencia de las vías de transducción de señales para la eritropoyesis. Los valores de eritropoyetina están elevados, lo que indica que la anemia no se debe al déficit de esta proteína (Levy, 2000; Young y col., 2000).

Con frecuencia se observan reducciones del número total de leucocitos es frecuente (leucopenia), debido a una reducción del número de granulocitos y linfocitos. Los neutrófilos y sus precursores están infectados en las viremias persistentes y en las fases latentes de la enfermedad. La neutropenia es más común que los procesos mieloproliferativos y puede presentarse de forma transitoria, cíclica o permanente, considerándose por algunos como un signo preneoplásico (Shelton y Linenberger, 1995; Hofmann-Lehmann y col., 1997;

Brown y Rogers, 2001). Aunque la patogenia no se conoce en su totalidad, el principal mecanismo que produce las neutropenias es el efecto citopático del virus sobre los precursores de neutrófilos. Además disminuye la funcionalidad de estas células, especialmente la explosión respiratoria y la formación de fagolisosomas con peróxido de hidrógeno (Lafrado y Olsen, 1986; Hofmann-Jagielska y col., 2005).

El síndrome similar a la panleucopenia felina o mieloblastopenia es una leucopenia grave que se acompaña de anemia, enteritis y destrucción del epitelio de la cripta intestinal. Para provocar este cuadro es necesario que FeLV coninfecte con el virus de la panleucopenia felina.

FeLV también infecta a los megacariocitos, produciendo alteraciones en la cantidad, el tamaño, la morfología y la función de las plaquetas, debidas a la supresión o infiltración tumoral de la médula ósea (Weiss, 2003). Esta anomalía plaquetaria provoca a menudo que los animales afectados padezcan frecuentes hemorragias en distintas localizaciones (Escolar y col., 2006).

1.2.4.3. Inmunosupresión

Una parte importante de la morbilidad y mortalidad de FeLV tiene como origen la supresión inmunológica y la predisposición a infecciones secundarias como consecuencia de ello (Diehl y Hoover, 1992). Los mecanismos exactos por los que el virus daña el sistema inmunológico no se conocen exactamente, aunque parecen existir evidencias que la proteína transmembrana p15E puede ser en parte responsable de los efectos inmunosupresores (Copelan y col., 1983; Dunham y Graham, 2008). Las variantes virales inmunosupresoras, como FeLV-T, requieren dos moléculas receptoras, Pit1 y FeLIX, para infectar los linfocitos. FeLIX se sintetiza a partir de genes de provirus endógenos (Barr, 1996; Hartmann, 2008).

Los gatos afectados pueden desarrollar atrofia tímica y depleción de zonas paracorticales de ganglios linfáticos. Se altera el número y funcionalidad de los neutrófilos, disminuyendo su actividad fagocítica y quimiotáctica. Los recuentos de linfocitos T CD4⁺ disminuyen, por lo que se invierte el cociente CD4⁺/CD8⁺ (Quackenbush y col., 1990; Dunham y Graham, 2008), aunque es común que los linfocitos T CD8⁺ también se vean afectados (Hoffmann-Fezer y col., 1996; Lutz y col., 2009; Hartmann, 2012). También se altera la inmunidad innata al modificarse la funcionalidad de los polimorfonucleares (Dunham y Graham, 2008).

Los linfocitos T de estos animales producen niveles significativamente inferiores de factores estimulantes de los linfocitos B, situación que se agrava con el avance de la enfermedad. A pesar de que disminuye la inmunidad humoral a la estimulación específica, se observan aumentos no específicos de IgG e IgM (Diehl y Hoover, 1992; Miró y col., 2007).

1.2.4.4. Otros signos clínicos

Durante la infección pueden aparecer de forma más o menos frecuente otros procesos clínicos como son (García y Barneto, 2006; Dunham y Graham, 2008; Lutz y col., 2009; Hartmann, 2012):

- Signos neurológicos: Dependerán de la zona afectada. Durante la fase de viremia es posible que los virus atraviesen la barrera hematoencefálica, solos o vehiculados por linfocitos y monocitos, infectando células endoteliales y células de la microglía, astrocitos y neuronas, dando lugar a alteraciones neurológicas y de comportamiento (Sanders y col., 2001). FeLV es capaz de infectar el sistema nervioso central (SNC), desarrollando un cuadro conocido como “síndrome neurológico o mielopatía asociada a FeLV” (Carmichael y col., 2002). En la neuropatogenia podría estar implicada la glucoproteína de la envoltura gp70, que aumenta la concentración de calcio intracelular en las neuronas que infectan (Carmichael y col., 2002; Doménech y col., 2006).
- Caquexia y atrofia muscular.
- Alteraciones orales (úlceras orales, gingivostomatitis, etc.), oculares (uveítis), y cutáneas.
- Trastornos digestivos, tales como diarreas hemorrágicas, vómitos, anorexia, pérdida de peso.

- Infertilidad, reabsorción fetal, abortos (particularmente en gatas con leucopenia), normalmente a término, y mayor mortalidad neonatal.
- Enfermedades inmunomediadas como la anemia hemolítica inmunomediada o por depósitos de inmunocomplejos, como glomerulonefritis, poliartritis crónica progresiva, uveítis, etc.
- Otros procesos, como osteocondromatosis, disfunción pituitaria y adrenocortical, etc.

1.2.5. Diagnóstico

El diagnóstico clínico de esta enfermedad es prácticamente imposible, ya que no existe ningún signo clínico patognomónico, e incluso los gatos pueden no presentar signos clínicos. Por ello es necesario utilizar técnicas laboratoriales para identificar los animales infectados. Las técnicas más empleadas son las serológicas en muestras sanguíneas. Sin embargo, cuando se sospeche de estados de latencia o en resultados discordantes, es recomendable aplicar estos métodos en muestras de médula ósea; no es aconsejable como técnica de rutina por la dificultad en obtención de la misma.

Las pruebas utilizadas son directas, ya que los métodos indirectos son difíciles de interpretar debido a la formación de anticuerpos contra virus endógenos (Lutz y col., 2009)

1.2.5.1. Pruebas serológicas

Por su sencillez, rapidez y por no necesitar un equipo complementario para realizarla, el sistema **ELISA** en soporte de papel es el más difundido actualmente para la detección de FeLV. En este caso la reacción inmunoenzimática está dirigida a la detección del antígeno p27 (Dunham y Graham, 2008; Levy y col., 2008a; Lutz y col., 2009; Little y col., 2011; Willet y Hosie, 2013); esta proteína puede detectarse durante la fase primaria de la viremia. Además se produce en exceso durante la replicación del virus por lo que se alcanzan altos niveles en sangre fácilmente detectables. Se recomienda la detección en sangre completa, suero o plasma, evitando el uso de lágrima o saliva (Little y col., 2011).

En algunos estudios se ha detectado una alta proporción de animales falsos positivos y falsos negativos. Por ello y como consecuencia de la repercusión de este resultado, se recomienda utilizar una técnica complementaria de confirmación al ELISA (Hartmann y col., 2007; Dunham y Graham, 2008; Lutz y col., 2009; Willet y Hosie, 2013) o utilizar un test de otro fabricante (Little y col., 2011).

Cuando se obtiene un resultado negativo y se ha producido una situación de riesgo reciente es necesario repetir el test al menos 30 días tras la situación de riesgo (Levy y col., 2008a; Little y col., 2011).

Los gatos infectados *in utero* pueden ser negativos a los test hasta meses después del nacimiento (Levy y Crawford, 2004; Little y col., 2011). Por otro lado, se ha determinado que los anticuerpos calostrales no afectan a la interpretación de estos test ELISA (Little y col., 2011).

Otra prueba serológica es la **inmunofluorescencia directa** (IFD), que se emplea para la detección de células (linfocitos, neutrófilos o plaquetas) infectadas por FeLV utilizando anticuerpos monoclonales anti-p27 marcados con fluoresceína (Dunham y Graham, 2008; Lutz y col., 2009). Los test para su detección no serán positivos hasta que se produzca una viremia secundaria posterior a la infección de la médula ósea (Levy y col., 2008; Little y col., 2011). Es menos utilizada en la clínica diaria ya que necesita un equipo profesional y técnico más sofisticado para poder realizarla.

1.2.5.2. Pruebas virológicas

El **cultivo y aislamiento** del virus es un método poco utilizado, ya que necesita medios técnicos y humanos mayores que otras técnicas, y es más lento y laborioso (Lutz y col., 2009). Se utilizan células primarias o líneas celulares en las que, tras cocultivar la muestra problema, se comprueba si aparecen fenómenos citopáticos

(Gómez-Lucía y col., 2006; Dunham y Graham, 2008). Se la considera el “*Gold Standard*” para identificar la infección progresiva en los gatos infectados por FeLV (Little y col., 2011).

La detección de la viremia es fundamental para el control de la enfermedad debido a que los gatos virémicos son infecciosos a otros gatos y su supervivencia es inferior a tres años en la mayoría de los casos (Dunham y Graham, 2008).

1.2.5.3. Pruebas moleculares

La reacción en cadena de la polimerasa (**PCR**) permite detectar provirus en las células de la sangre, la médula ósea u otros tejidos frescos (Jackson y col., 1996; Miyazawa y Jarrett, 1997; Arjona y col., 2007; Dunham y Graham, 2008) o formolizados (Ellis y col., 1996). Está especialmente indicada en los casos de infecciones latentes o alta respuesta inmunitaria, donde el antígeno se encuentra en baja cantidad (Kipar y col., 2001) o de aquellos tejidos donde se produce secuestro vírico (Miyazawa y Jarrett, 1997). Es una técnica con muy alta sensibilidad, especificidad y rapidez.

Otras variantes de la PCR que se emplean son **RT-PCR** (en la que se detecta directamente el virión y no su forma provírica) (Tandon y col., 2005; Gomes-Keller y col., 2006a y b), y **PCR a tiempo real o cuantitativa** (que permite cuantificar el virus o provirus en sangre) (Lutz y col., 2009), la PCR a tiempo real puede ser un método más sensible que podrá resolver casos discordantes (Levy y col., 2008a). Sin embargo, algunos estudios señalan que la PCR no permite distinguir entre animales virémicos y no virémicos (Dunham y Graham, 2008).

1.2.5.4. Protocolo diagnóstico e interpretación de resultados

En el momento de realizar el diagnóstico es importante tener en cuenta la patogenia de la enfermedad y, sobre todo, la etapa en la que cada una de las pruebas resulta útil. En primer lugar hay que saber que:

- p27 libre sólo alcanza niveles detectables en sangre tras unas dos semanas post-infección, aunque en ocasiones puede tardar incluso tres meses (Levy y col., 2008a).
- Para detectar provirus en sangre es necesario que el virus haya alcanzado la médula ósea; además, su presencia no es continua.

Al realizar distintas técnicas en dos momentos diferentes, separados dos meses, los resultados pueden ser concordantes o discordantes. Esto se interpretaría (Gómez-Lucía y col., 2006):

- si en ambas ocasiones el resultado es negativo, el gato se considera libre de la infección,
- si en ambas ocasiones el resultado es positivo, se asume que el virus ha infectado la médula ósea y se están eliminando partículas víricas, y por tanto, la enfermedad se encuentra en fase progresiva,
- si el primer resultado es negativo y el segundo positivo, es indicativo de que el virus ha alcanzado la médula ósea, se está expresando, se ha producido una infección o se ha reactivado una infección latente,
- si el primer resultado es positivo y el segundo negativo indica que la respuesta inmunitaria del gato ha sido capaz de eliminar la infección (infección regresiva) o que el virus ha infectado la médula ósea pero no se eliminan células infectadas o antígeno p27 (infección latente).

Una discordancia persistente puede ser debida a infecciones localizadas en tejidos linfoides (bazo, linfonódulos), glándulas salivares u otros tejidos generalmente diferentes de la médula ósea y que, según algunos autores, son frecuentes (Hayes y col., 1992; Wolf, 2000; Herring y col., 2001). Estos gatos se consideran avirémicos e incapaces de excretar virus infecciosos, aunque eliminan partículas víricas, ya que suelen ser defectivas y no infectantes; sin embargo, existe cierto riesgo de que la infección alcance la médula ósea y entonces los gatos se conviertan en transmisores de virus infecciosos (Jarrett y col., 1991; Gómez-Lucía y col., 2006; Dunham y Graham, 2008).

1.2.6. Tratamiento

No existe un tratamiento curativo para esta enfermedad. Actualmente, además de resolver los signos clínicos que se presentan según la evolución de la enfermedad mediante tratamientos sintomáticos (antibioterapia, quimioterapia) (Lutz y col., 2009), se pueden utilizar fármacos inmunomoduladores que estimulen las propias defensas del gato y antivíricos que inhiban alguna de las fases de la replicación vírica.

1.2.6.1. Tratamiento inmunomodulador

A través de estos tratamientos se actúa de manera indirecta sobre la infección vírica, ya que estimulan la respuesta inmunitaria del gato. Los más utilizados son:

- Acemannan®: es un mucopolisacárido procedente de la planta *Aloe vera*. En ensayos *in vitro* se ha comprobado que estimula la fagocitosis de macrófagos y tiene actividad antivírica. En los gatos estimula la actividad de las citoquinas producidas por macrófagos (IL-1, IFN, TNF- α) y de PGE₂. En gatos FeLV positivos sintomáticos aumenta el apetito, mejora los parámetros hematológicos y el estado general de los mismos, incrementando su calidad de vida y supervivencia (Sheets y col., 1991; Collado y col., 2006).
- Proteína A estafilocócica (SPA): es un componente de la pared celular del *Staphylococcus aureus* cepa Cowan I. Este polipéptido es un agente inmunomodulador activador de los linfocitos B y T que induce la producción local de interferón. Existe cierta controversia en cuanto a los resultados que produce (Engelman y col., 1987; McCaw y col., 2001).
- *Parapoxvirus ovis* inactivado (Baypamun®): induce la producción de interferón y del factor de crecimiento de colonias de granulocitos (G-CSF). Los estudios iniciales sugerían que se eliminaba la viremia (Hörber y Mayr, 1991; Hörber y col., 1992); sin embargo, estudios posteriores no han observado diferencias significativas en cuanto a los parámetros virológicos, inmunológicos, laboratoriales y clínicos entre el grupo tratado y el grupo control (Sellon y Hartmann, 2008; Lutz y col., 2009).
- Bacille Calmette-Guérin, Lactoferrina bovina, Dietilcarbamicina, Levamisol, *Propionibacterium acnes*, *Serratia marcescens* (Levy y col., 2008a).
- Interferón (apartado 1.4.10.).

1.2.6.2. Tratamiento antivírico

Aunque se han realizado estudios en los que se utilizan antivíricos como la zidovudina, didanosine, zalcitabine, ribavirina, foscarnet, etc, no existe ningún protocolo estandarizado para el tratamiento de FeLV y algunos de ellos provocan efectos secundarios graves. La necesidad de aplicar un tratamiento de por vida para inhibir la replicación y permitir la recuperación del animal obliga a la que el tratamiento sea eficaz en forma oral, económico y no tóxico (Hartmann, 2008).

La zidovudina o AZT es menos eficaz en el caso de FeLV que en otras retrovirusosis, como por FIV o HIV. Inhibe la replicación del virus, puede reducir la carga vírica, mejora la calidad y esperanza de vida, aunque algunos estudios no han observado diferencias significativas al utilizar esta molécula (Hartmann y col., 2002). Las dosis que han demostrado eficacia pueden provocar anemia no regenerativa que se recupera tras el tratamiento (Levy y col., 2008; Lutz y col., 2009). Además, a día de hoy, su uso está restringido al ámbito hospitalario (Fuente: Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios).

Otras moléculas como la ribavirina, zalcitabina, o el foscarnet han mostrado toxicidad y no se recomienda su uso en gatos (Swenson y col., 1991; Weiss y col., 1993; Collado y col., 2006; Levy y col., 2008).

1.2.7. Inmunoprofilaxis

Las primeras vacunas que se probaron estaban basadas en virus vivos atenuados, pero aumentaban la inmunosupresión, favorecían el desarrollo de tumores, se integraban y recombinaban con secuencias

endógenas del genoma de los gatos y en algunos cachorros producían el desarrollo del cuadro clínico (Hartmann, 2008; Poulet y col., 2003). Debido a estos problemas se optó por el desarrollo de vacunas inactivadas que mostraron poca eficacia (Dunham y Graham, 2008).

Desde entonces, han aparecido varias vacunas en el mercado, tanto de virus inactivado como de proteínas de subunidades y recombinantes (Willet y Hosie, 2013). En la actualidad, la Agencia Europea para Evaluación de Medicamentos (EMA) tiene registradas varias vacunas en las que FeLV está presente como un único antígeno vírico o formando parte de una vacuna polivalente. La gran ventaja de la vacunación frente a FeLV es que no interfiere con su diagnóstico.

De las vacunas disponibles, las de virus vivo recombinante son las que han mostrado mayor eficacia, ya que estimulan las respuestas inmunes humoral y celular. Las mejoras de las vacunas para la leucemia felina se basan en incrementar la inmunidad local a nivel de mucosas, disminuir la replicación vírica inicial en el caso de infección, y disminuir el riesgo de desarrollar latencia en gatos vacunados (Doménech y col., 2006).

La eficacia y seguridad de la vacuna continua cuestionada. En algunos experimentos se ha demostrado que la vacuna no es totalmente efectiva frente al desarrollo de una infección persistente y latente (Jarret y Ganière, 1996; MacDonald y col., 2004; Hofmann-Lehmann y col., 2006; Dunham y Graham, 2008; Lutz y col., 2009).

Aunque la vacunación ha coincidido con un retroceso de la prevalencia, este descenso no es sólo atribuible a la vacunación sino que está favorecido por una combinación de vacunación y manejo (Dunham y Graham, 2008; Little y col., 2011). De hecho no debe utilizarse la vacuna como un método de control de la enfermedad, sino que es necesario complementarlo con un buen manejo (Little y col., 2011). Así, hoy en día el método más eficaz para disminuir el contagio entre animales es la detección mediante diagnósticos precoces y regulares de los animales infectados y su aislamiento o eliminación (Cotter, 1992; Louwerens y col., 2005; Doménech y col., 2006; Hartmann, 2008). En cualquier caso, la vacunación se recomienda en gatos con alto riesgo de exposición a FeLV.

Un problema importante por sus consecuencias éticas y terapéuticas que se asocia a la vacunación contra FeLV es el desarrollo de sarcomas. Se definen como fibrosarcomas (en su mayoría) sólidos, invasivos, recurrentes, prominentes, no dolorosos, firmemente adheridos a tejidos adyacentes y potencialmente letales que se asocian con una inflamación crónica inducida en el punto de inoculación de la vacuna por el proceso traumático en sí, y/o las sales de aluminio incorporadas como adyuvante a las vacunas, normalmente de FeLV y de rabia (Sparkes, 1997; Jelinek, 2003; Kirpensteijn, 2006; Dunham y Graham, 2008; Willet y Hosie, 2013; Hartmann y col., 2015). Debido a esta circunstancia la Sociedad Americana de Veterinarios Felinos solo recomienda incluir la vacunación en aquellos gatos con riesgo de contraer la enfermedad (Dunham y Graham, 2008). El uso de la vacunación recombinante con canarypoxvirus permite eludir el inconveniente de utilizar adyuvantes y estimular la respuesta humoral y celular a varias proteínas víricas, facilitando así la aceptación de esta vacuna (Willet y Hosie, 2013).

En algunas vacunas no se ha observado el desarrollo de un título de anticuerpos protectores significativo (Hofmann-Lehmann y col., 2006; Dunham y Graham, 2008). Los linfocitos T específicos de FeLV parecen mostrar importancia en la protección de las vacunas, observándose en la sangre y tejidos linfoides de los gatos vacunados (Flynn y col., 2000a; Hanlon y col., 2001; Dunham y Graham, 2008).

1.3. Inmunodeficiencia Felina

1.3.1. Etiología

1.3.1.1. Virus de la Inmunodeficiencia Felina (FIV)

El virus de la inmunodeficiencia felina (FIV) es un retrovirus del género *Lentivirus* (Hosie y col., 2009). Fue aislado por primera vez en la Universidad de Davis (California), cuando se detectó un virus T-linfotropo que afectaba a gatos domésticos (Pedersen y col., 1987). Además de su evidente importancia veterinaria, también es interesante por su gran similitud con el virus de la inmunodeficiencia humana (HIV), no sólo a nivel de morfología y distribución del genoma, sino también de tropismo celular y patogenicidad, hasta el punto de ser considerado como el modelo de HIV más adecuado *in vitro* e *in vivo* (Bendinelli y col., 1995; Burkhard y Dean, 2003; Hosie y col., 2009). Las partículas víricas tienen 105-125 nm diámetro (Gómez-Lucía y col., 2006). Como el resto de los lentivirus, posee core tronco-cónico (Figura 1.3.1.). Las proteínas que conforman el virión y los genes que las codifican se muestran en la Tabla 1.3.1.

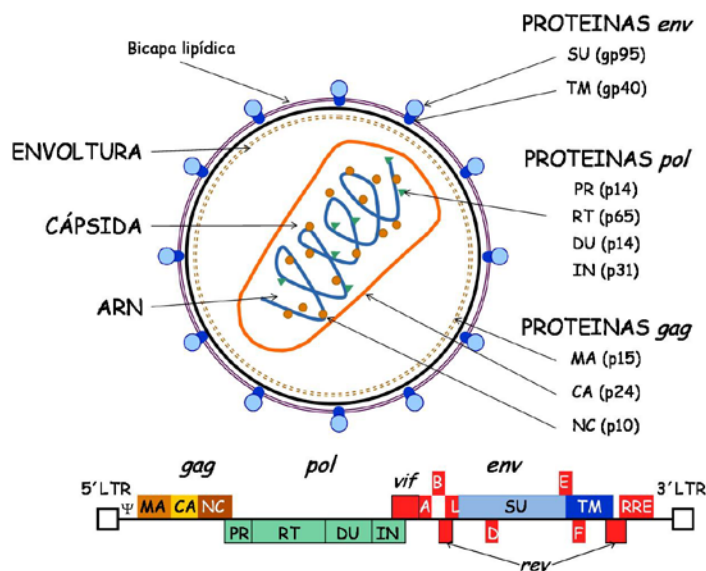


Figura 1.3.1. Esquema de una partícula y del genoma proviral de FIV.

Se han identificado regiones de SU que presentan gran variabilidad, denominadas V1 a V5 (Gómez-Lucía y col., 2006). La variabilidad de alguna de ellas va a permitir clasificar a los virus en cinco tipos (apartado 1.3.1.2.).

Las proteínas internas (p15, p24 y p10) son altamente inmunogénicas, por lo que la mayoría de los gatos infectados poseen anticuerpos frente a las mismas. Sin embargo, no son neutralizantes, y por tanto, protectores. No obstante, tienen gran importancia diagnóstica, ya que el diagnóstico serológico de la enfermedad se basa en la detección de anticuerpos frente a p24.

Además de los genes comunes a todos los retrovirus (*gag*, *pol* y *env*), FIV posee una serie de genes reguladores que modulan su infectividad (Dunham y Graham, 2008).

- *rev*: codifica una proteína de 23 kDa que al unirse con su receptor (elemento de respuesta Rev - RRE) promueve el transporte y aumenta la estabilidad de ARNm vírico del núcleo al citoplasma celular, actuando como un regulador post-transcripcional (Elder y col., 2008).
- *vif* (factor de infectividad vírica): codifica una proteína con el mismo nombre, común a todos los lentivirus salvo al de la anemia infecciosa equina. Aunque todavía no se ha definido su papel con total

claridad parece que en FIV podría actuar en las etapas iniciales del ciclo vírico (Gonçalves y col., 1995; Chatterji y col., 2000).

- *orf-A* u *orf-2*: ocupa un lugar similar a los genes *tat* en otros lentivirus; su función parece ser la de facilitar la transactivación de la transcripción incrementando la actividad promotora de los LTRs (Chatterji y col., 2002).
- Existen otros ORFs presentes en el genoma de FIV, pero todavía no se ha identificado cuál es la función de la proteína codificada; además no se ha evidenciado ninguna homología con las secuencias de genes reguladores de HIV (Sundstrom y col., 2008).

Tabla 1.3.1. Genes y proteínas del virus de la inmunodeficiencia felina (FIV)

Gen	Nombre-función	Nombre de la proteína
<i>env</i>	SU Superficie	gp95
	TM Transmembrana	gp40
<i>gag</i>	MA Matriz	p15
	CA Cápsida	p24
	NC Nucleocápsida	p10
<i>pol</i>	PR Proteasa	p14
	IN Integrasa	p31
	RT Transcriptasa inversa	p65
	dUTPasa	p14

1.3.1.2. Clasificación de FIV

Teniendo en cuenta la diversidad genética de las regiones V3 a V5 de SU se han establecido cinco subtipos genéticos, que coinciden con su distribución geográfica: A en EE.UU., Australia y Europa; B en Japón, Europa y EE.UU.; C en Canadá, Taiwán y Vietnam; D en Japón, Vietnam y E en Argentina, aunque la mayoría de los identificados pertenecen al subtipo A y B. Presentan una variabilidad genética en *env* superior al 25-30% (Hosie y col., 2009; Dunham y Graham, 2008).

Además, se han identificado y clasificado varias secuencias recombinantes entre los subtipos A y B, los subtipos B y D y los subtipos A y C (Duarte y Tavarés, 2006).

1.3.1.3. Replicación vírica

Al contrario que FeLV, FIV puede replicarse en células que se encuentren metabólicamente inactivas. FIV requiere de receptores primarios y secundarios. El receptor primario es CD134, que se expresa en los linfocitos T CD4⁺, los linfocitos B y los macrófagos activos (Shimojima y col., 2004; Willet y col., 2007). El receptor secundario es CXCR4 análogo al de HIV (Dunham y Graham, 2008).

1.3.2. Epidemiología

1.3.2.1. Distribución y prevalencia

El virus presenta una distribución mundial pero, a diferencia del FeLV, la prevalencia de la infección varía entre las diferentes localizaciones geográficas (Hartmann, 2008; Rupérez y col., 2006). En España, los primeros casos fueron diagnosticados en 1990 (Lloret y col., 1990). Un estudio en la Comunidad de Madrid refleja prevalencias del 9,4% en gatos sanos, y 16,4% en gatos enfermos (Arjona y col., 2000).

1.3.2.2. Hospedadores

El hospedador natural es el gato doméstico. Sin embargo, se han descrito casos de félidos salvajes infectados por FIV (Leutenegger y col., 1999a; Nishimura y col., 1999), aunque en la mayoría de las ocasiones no se aíslan los virus típicos del gato doméstico, sino lentivirus relacionados (Olmsted y col., 1992; Franklin y col., 2007a y b). Los gatos domésticos son susceptibles a los aislados víricos de los félidos salvajes, pero no se observa ni el cuadro clínico ni los desórdenes inmunológicos asociados a FIV (VandeWoude y col., 1997a y b), aunque pueden disminuir la inmunidad y agravar el cuadro clínico de inmunodeficiencia felina (VandeWoude y col., 2003).

1.3.2.3. Fuentes de infección y transmisión

La principal vía de transmisión de FIV es la inoculación parenteral de sangre y/o saliva (Park y col., 1995; Levy y col., 2008), lo que suele ocurrir a través de mordeduras y heridas producidas por agresiones (Dunham y Graham, 2008; Hosie y col., 2009). Por ello se le conoce como el “retrovirus de los gatos enemigos”.

La transmisión materno-filial, durante la gestación o la lactación, es posible e incluso puede alcanzar el 50% (Burkhard y Dean, 2003; Dunham y Graham, 2008). La alta mortalidad y rápida evolución de los gatitos infectados por FIV podría haber restado importancia a la transmisión a través de esta vía. La concentración del virus en la leche es mayor incluso que en el plasma o las células de la glándula mamaria (Burkhard y Dean, 2003). Es importante señalar que no todos los gatos de una camada adquieren la infección (Sellon y Hartmann, 2008) y que esto depende del estado de salud de la madre (Hosie y col., 2009).

A pesar de que hay evidencias experimentales de la transmisión vía mucosas (Burkhard y Dean, 2003), no hay constancia de que tengan un importante papel en el mantenimiento del virus en la naturaleza. Se ha documentado que FIV se puede transmitir a través de semen, bien de forma natural o por inseminación artificial, de virus libre o asociado a células (Jordan y col., 1998a y b).

También se ha descrito la transmisión después de la inoculación oral, intravaginal o intrarrectal (Bishop y col., 1996). El tracto reproductivo felino posee una variedad de células diana para FIV, tales como linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺, linfocitos B, macrófagos y células dendríticas. La difusión sistémica tras la inoculación en las distintas mucosas puede ocurrir en pocos días (Burkhard y Dean, 2003).

1.3.2.4. Factores de riesgo

Los factores considerados de riesgo para la transmisión de la inmunodeficiencia felina son:

- Sexo: la prevalencia de la enfermedad es superior en machos enteros que en hembras y machos castrados. Esto parece deberse al dimorfismo sexual en cuanto al comportamiento agresivo (Natoli y col., 2005; Sellon y Hartmann, 2008; Dunham y Graham, 2008; Hosie y col., 2009) y los hábitos territoriales, que desarrollan en mayor medida los machos no castrados.
- Edad: por iguales causas que lo anterior, la infección se detecta en mayor proporción en gatos adultos (Natoli y col., 2005; Hosie y col., 2009).
- Jerarquización: la jerarquización de la población y el enfrentamiento entre individuos afecta en gran medida a su transmisión (Natoli y col., 2005).
- Comportamiento reproductivo: además de las peleas entre machos durante el celo, se puede producir la transmisión de FIV a través de mordeduras en la región dorsal del cuello (durante la monta) o por vía venérea de machos a hembras (Rupérez y col., 2006).

1.3.3. Patogenia

1.3.3.1. Evolución de la infección.

La evolución y progresión de la infección va a depender de diferentes factores, entre ellos la edad, las propiedades del propio virus, la cantidad de virus inoculado, la vía de infección (Sellon y Hartmann, 2008).

La infección por FIV produce un cuadro de inmunodeficiencia similar al inducido por el HIV humano; de ahí que FIV se considera el mejor modelo animal para estudiar esta retrovirosis humana.

El virus, que penetra vía parenteral, se replica en los linfocitos T y B, en células dendríticas y en macrófagos de los ganglios linfáticos regionales y otros órganos linfoides. Desde este punto se produce la liberación de partículas víricas que dan lugar a una viremia inicial y transitoria que dura 8-12 semanas, y que se acompaña de signos clínicos inespecíficos, como fiebre, anorexia, decaimiento, linfadenomegalia y leucopenia transitoria (Yamamoto y col., 1988b; Callanan y col., 1992; Levy y col., 2008; Sellon y Hartmann, 2008; Hosie y col., 2009; Dunham y Graham, 2008). La linfadenomegalia es debida al aumento del número y el tamaño de los centros foliculares germinales y puede permanecer durante semanas y meses (Dunham y Graham, 2008). La viremia permite al virus diseminarse y alcanzar los linfocitos, monocitos y macrófagos de médula ósea, tracto intestinal, pulmón, riñón y cerebro. El sistema inmunitario desarrolla una respuesta de tipo celular y humoral en 2-4 semanas, aunque si la dosis inicial de FIV es muy baja no aparecen hasta meses o incluso un año después de la primoinfección (Yamamoto y col., 1988b; Inoshima y col., 1996; Sellon y Hartmann, 2008; Dunham y Graham, 2008). Esta respuesta no puede eliminar totalmente la infección, ya que el virus queda acantonado en la médula ósea y otros órganos (Yamamoto y col., 1988b; Inoshima y col., 1996; Flynn y col., 2002a; Paillot y col., 2005) (Figura 1.3.2.).

A partir de este momento se inicia un periodo asintomático, en el que el virus se replica de forma leve en los órganos donde está acantonado y el gato no presenta ningún signo clínico relacionado con la enfermedad (Dunham y Graham, 2008; Hosie y col., 2009). Sin embargo, debido al efecto citopático del virus sobre los linfocitos T CD4⁺, se produce el debilitamiento paulatino del sistema inmunitario, disminuyendo el número de estos linfocitos, generalmente por procesos de apoptosis (Callanan y col., 1992; Tompkins y col., 2002), y su funcionalidad (Sellon y Hartmann, 2008). Este descenso de los linfocitos T CD4⁺, junto con el aumento de linfocitos T CD8⁺ α/β (Callanan y col., 1992; Paillot y col., 2005), provoca una disminución del cociente CD4⁺/CD8⁺, convirtiendo a esta relación en uno de los marcadores inmunopatológicos más importantes. Al contrario de lo que ocurre en FeLV, en FIV no se establece una latencia verdadera sino una latencia clínica, es decir, no hay signos clínicos evidentes pero el ARN o las proteínas víricas pueden detectarse en los tejidos del gato ya que hay una continua replicación vírica pero a niveles muy bajos (Sellon y Hartmann, 2008).

FIV puede infectar un amplio rango de tipos celulares. FIV, a diferencia de HIV, no utiliza una molécula CD4 para penetrar en la célula. Se ha descrito la molécula receptora CXCR4 que se encuentra en diferentes tipos celulares como linfocitos, astrocitos, células mononucleares intraepiteliales y epiteliales, etc. Sin embargo, algunas células que expresan esta molécula no son susceptibles a la infección, por lo que parece probable que para su establecimiento se requieran otras moléculas receptoras o modos de entrada complementarios o adicionales, como CCR5, infección intercelular o mediada por inmunoglobulina a macrófagos y linfocitos B (Lerner y Elder, 2000; Frey y col., 2001; Willett y col., 2002; Sellon y Hartmann, 2008)

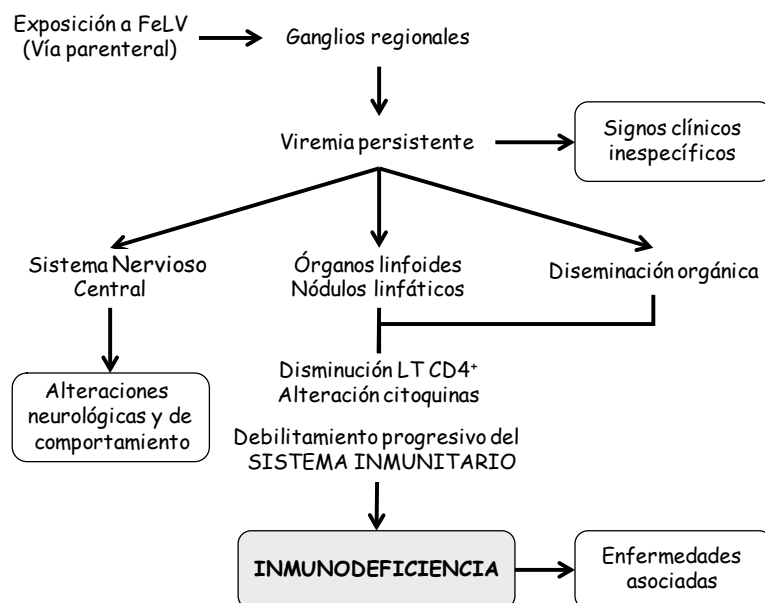


Figura 1.3.2. Patogenia de la inmunodeficiencia felina.

1.3.3.2. Respuesta inmunitaria

La característica distintiva de la patogénesis de FIV es el trastorno progresivo de la función inmunitaria (Hartmann, 2012). Como se ha mencionado anteriormente, debido al efecto citopático del virus sobre los linfocitos T CD4⁺, se produce el debilitamiento paulatino del sistema inmunitario, disminuyendo el número de estos linfocitos, generalmente por procesos de apoptosis, y su funcionalidad. Las causas de pérdida de linfocitos T CD4⁺, además de por el efecto citopático del virus, pueden deberse a una disminución de la producción o ser secundaria a la infección tímica o de la médula ósea (Callanan y col., 1992; Tompkins y col., 2002; Sellon y Hartmann, 2008; Hosie y col., 2009). Se ha documentado también apoptosis de linfocitos T CD4⁺ y linfocitos B en ganglios, bazo y timo de gatos infectados por FIV (Holznagel y col., 1998; Sarli y col., 1998; Tompkins y col., 2002). Este descenso de los linfocitos T CD4⁺, junto con el aumento de linfocitos T CD8⁺ α^+/β^- que se produce en algunos casos (Callanan y col., 1992; Paillot y col., 2005), provoca una disminución del cociente CD4⁺/CD8⁺, convirtiendo a esta relación en uno de los marcadores inmunopatológicos más importantes.

La respuesta humoral normalmente se desarrolla en las primeras semanas posteriores a la infección. En primer lugar surgen anticuerpos frente a las glucoproteínas de la envoltura vírica (principalmente gp95); estos anticuerpos son neutralizantes, e impiden que el virus penetre en la célula. De forma menos consistente, se forman anticuerpos frente a otras proteínas de la cápsida (fundamentalmente p24), de transmembrana y RT (Inoshima y col., 1996; Sellon y Hartmann, 2008). Los niveles de anticuerpos se mantienen de forma constante durante la infección por FIV, puesto que los linfocitos B siguen estimulándose y produciendo anticuerpos. Como en otros lentivirus, el virus puede escapar a la acción de estos anticuerpos generando variantes antigénicas (Sellon y Hartmann, 2008; Hosie y col., 2009). Solamente al final de la enfermedad se produce un descenso del nivel de anticuerpos debido a la inmunosupresión (Pedersen y col., 1987). Por tanto la aparición de anticuerpos no se relaciona con una curación de la infección y, al igual que en otros *Lentivirus*, sólo son indicativas de una infección persistente.

La marcada hipergammaglobulinemia (Flynn y col., 1994; Miro y col., 2007; Levy y col., 2008) es responsable de la formación de inmunocomplejos circulantes que producen lesiones en diferentes órganos (riñones, articulaciones) (Sellon y Hartmann, 2008).

La respuesta celular es más rápida que la humoral, apareciendo en la primera semana post-infección y previo a la aparición de los anticuerpos neutralizantes (Yamamoto y col., 1988; Beatty y col., 1996). Persiste durante todo el periodo asintomático de la enfermedad pero no parece ser capaz de eliminar el virus, ya que los gatos se mantienen infectados de por vida.

La infección por FIV altera la producción de citoquinas por los linfocitos T CD4⁺, CD8⁺ y macrófagos (Beatty y col., 1996; Levy y col., 1998; Paillot y col., 2005), lo que causa un desequilibrio de toda la red de citoquinas, favoreciendo la evolución de la propia enfermedad y la aparición y desarrollo de infecciones secundarias. Las alteraciones más destacables son:

- Fase inicial o asintomática: A pesar de que la respuesta inmunitaria humoral es fuerte, la evidencia actual sugiere que la inmunidad mediada por linfocitos T CD8⁺ y factores solubles, IL-16 entre otros, es la responsable de la inhibición de la producción viral temprana después de la infección viral (Crawford y col., 2001). También se han observado incrementos de interferón (IFN γ), factor de necrosis tumoral (TNF α) e interleuquinas -4,-6,-10 y -12 (Lerner y col., 1998; Levy y col., 1998; Liang y col., 2000; Orandle y col., 2000; Ritchey y col., 2001).
- Fases avanzadas: disminuyen los niveles de IL-2, IL-12 e IFN γ (Liang y col., 2000), incrementándose marcadamente los de IL-10 (Levy y col., 1998). Los altos niveles de IL-10 y bajos de IL-12 (incremento del cociente IL-10/IL-12) podrían tener un papel primordial en la patogenia de FIV, ya que son responsables de que haya un cambio de la respuesta de tipo Th1 al tipo Th2, y por tanto, de la menor respuesta celular frente a patógenos secundarios (Levy y col., 2004).

Otra manifestación de la desregulación inmunológica observada en muchos gatos FIV⁺ es la hipergammaglobulinemia, principalmente por aumentos de IgG, y la formación de inmunocomplejos (Miró y col., 2007). También se han descrito alteraciones en la funcionalidad de neutrófilos y *natural-killer* (Sellon y Hartmann, 2008).

1.3.3.3. Neuropatogenia

FIV es capaz de atravesar la barrera hematoencefálica, solo o vehiculado por linfocitos y monocitos. En el sistema nervioso infecta diferentes células (células endoteliales, de la microglía, astrocitos y neuronas) y se replica a gran velocidad. Además, la barrera hematoencefálica no va a permitir que la respuesta inmunitaria sea efectiva, quedando el cerebro como un reservorio del virus (Hein y col., 2000, 2005).

La patogenia nerviosa parece estar asociada a la aparición de variantes neurotrópicas que aumentan el calcio intracelular de las células a las que infectan, al igual que ocurre con HIV. Este carácter neurotóxico parece depender de la gp120 (Hein y col., 2000; Carmichael y col., 2002; Hein y col., 2005) y la liberación de neurotoxinas (óxido nítrico) por parte de los macrófagos (Zhu y col., 2006).

1.3.4. Cuadro clínico

El cuadro clínico de FIV tiene muchas similitudes con el producido por el HIV. Clínicamente puede dividirse en cuatro fases (Sellon y Hartmann, 2008; Hosie y col., 2009; Hartmann, 2012):

1. Fase aguda inicial: se produce entre las cuatro y seis semanas post-infección, con signos clínicos inespecíficos que en ocasiones son leves y no se detectan, como fiebre o malestar. Pueden observarse enteritis aguda, estomatitis, dermatitis, conjuntivitis o alteraciones respiratorias. Es frecuente que en esta fase aguda se produzca una linfadenopatía generalizada (Obert y Hoover, 2000).
2. Fase asintomática: el gato no muestra manifestaciones de enfermedad; sin embargo, el sistema inmunitario va degenerando progresivamente. La duración de esta fase depende de la edad en que se infectó el animal, la exposición a otros agentes patógenos y el potencial genético del virus infectante, pero suele ser de cinco años o más.

3. Fase de reactivación vírica: se caracteriza por linfadenomegalia generalizada y persistente, y signos clínicos inespecíficos, como pérdida de peso, fiebre, anemia, leucopenia, decaimiento, etc. Es en esta fase cuando el propietario suele acudir al veterinario. Puede durar de varios meses a un año.
4. Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida Felina (FAIDS): debido al estado de inmunodeficiencia se producen infecciones secundarias y oportunistas en el aparato respiratorio, cavidad oral, conjuntiva, tracto urinario, piel, etc. Otras manifestaciones clínicas son enteritis crónica, lesiones cutáneas, insuficiencia renal, pérdida de peso (incluso caquexia), trastornos neurológicos, artritis inmunomediada, alteraciones hematológicas e inmunológicas y desarrollo de tumores.

1.3.4.1. Manifestaciones clínicas asociadas

Junto al cuadro de signos clínicos generales enunciado anteriormente aparecen una serie de procesos clínicos relacionados con la enfermedad (Hosie y col., 2009):

- Gingivoestomatitis crónica: la mitad de los gatos infectados por FIV presentan lesiones inflamatorias y/o necróticas en las encías, en las fauces y en la mucosa oral. Las lesiones están relacionadas con el sobrecrecimiento bacteriano, con infecciones concomitantes de calicivirus y herpesvirus, o con una respuesta inmunitaria exacerbada que produce un infiltrado linfoplasmocitario.
- Neoplasias: los linfomas, principalmente de linfocitos B (Beatty y col., 1998; Sellon y Hartmann, 2008), tumores mieloides, carcinomas y sarcomas son neoplasias comunes en los gatos infectados por FIV. Los gatos infectados con FIV tienen 5,6 veces más probabilidad de desarrollar un linfoma o una leucemia que un gato no infectado (García y Barneto, 2006). Existen discrepancias en el papel de FIV en la aparición de neoplasias, algunos autores señalan que se debe a un efecto indirecto del virus como consecuencia de la inmunosupresión o tener un papel oncogénico directo (Endo y col., 1997; Beatty y col., 1998 y 2002).
- Enfermedades del sistema nervioso central (SNC): las alteraciones neurológicas están asociadas a la infección vírica del SNC, a toxinas liberadas por las células infectadas o, en menor medida, a infecciones secundarias (Dow y col., 1990). Los signos clínicos que aparecen en este caso tienen relación directa con la localización de la infección (alteraciones del comportamiento, motoras, etc.)
- Trastornos gastrointestinales: entre un 10-20% de los gatos presentan diarreas crónicas. La etiología de estos procesos es debida al efecto directo del virus sobre los enterocitos o a infecciones concomitantes (Hopper y col., 1989; Ishida y col., 1989).
- Alteraciones renales: FIV favorece el desarrollo de insuficiencia renal. El depósito de inmunocomplejos puede dar lugar a glomerulonefritis, y en la vejiga de la orina puede producirse cistitis idiopática o bacteriana (Poli y col., 1995a y b).
- Otras alteraciones: debido principalmente a infecciones secundarias aparecen lesiones a nivel ocular, respiratorio, cutáneo, etc.

1.3.5. Diagnóstico

Aunque no cabe duda que el diagnóstico clínico puede ser orientativo, nunca se puede establecer un diagnóstico definitivo de FIV sin realizar pruebas laboratoriales, debido a la variabilidad del cuadro clínico, unido a la presencia de enfermedades concomitantes. Además, durante la fase de latencia clínica en la que no se presentan signos clínicos, los gatos infectados suponen un riesgo epidemiológico para el resto de la población felina.

1.3.5.1. Pruebas serológicas

La infección por FIV está correlacionada con la presencia elevada de anticuerpos anti-FIV por lo que la mayoría de los test diagnósticos están dirigidos a detectar dichos anticuerpos (Dunham y Graham, 2008; Hosie y col., 2009; Little y col., 2011).

Al igual que en FeLV, el sistema de diagnóstico más utilizado en la detección de animales infectados por FIV es el **ELISA**. En este caso, la reacción inmunoenzimática está dirigida a la detección de los anticuerpos anti-p24, que aparecen dentro de los 60 días post-infección y que se mantienen durante toda la vida del animal (Levy y col., 2008; Little y col., 2011), salvo en los casos de SIDA muy avanzado donde existe una gran inmunosupresión, dando lugar a falsos negativos. Existen en la actualidad diferentes sistemas ELISA que detectan estos anticuerpos frente a FIV, algunos de ellos incluso para el diagnóstico combinado con FeLV. Se utiliza sangre completa, suero o plasma.

Algunos sistemas de ELISA detectan directamente p24, si bien no son utilizados en el diagnóstico ya que esta proteína puede no encontrarse en cantidad suficiente en la sangre. La proteína p24 puede detectarse en neuronas, células endoteliales, y células de la glía (Carmichael y col., 2002; Zhu y col., 2006), pero se evidencia fundamentalmente mediante inmunofluorescencia directa (IFD).

La **inmunofluorescencia indirecta** también puede emplearse para la detección de anticuerpos frente a FIV, así como para titular el virus. Sin embargo, es una técnica poco utilizada debido a que necesita un equipo profesional y técnico especializado.

El **Western Blot** (WB) señala frente a qué proteínas se han desarrollado los anticuerpos (Bienzle y col., 2004). Normalmente no se producen anticuerpos frente a todas las proteínas de FIV y de forma general se acepta que la presencia de anticuerpos frente a dos proteínas es suficiente para considerar a un gato como positivo a FIV. Cuando sólo se producen anticuerpos frente a una proteína (Calandrella y col., 2001) es necesario utilizar otras pruebas diagnósticas para confirmar el resultado (Barr, 1996; Bienzle y col., 2004). No se utiliza de forma común en el diagnóstico de FIV debido al equipo técnico y profesional necesario.

1.3.5.2. Pruebas virológicas

Al igual que en FeLV, el diagnóstico de FIV puede realizarse también mediante **aislamiento** a partir de sangre, suero, plasma, líquido cefalorraquídeo y saliva y cultivo en linfocitos de sangre periférica o en líneas tumorales de linfocitos T. En esta técnica se cocultivan los linfocitos extraídos de la sangre periférica con linfocitos T felinos durante 2-3 semanas, confirmándose la presencia a través del nivel de proteínas del virus en los medios de cultivo. Se la considera el *“Gold Standard”* (Levy y col., 2009; Hosie y col., 2009; Little y col., 2011). La mayor concentración de virus en sangre se produce al inicio de la infección, y en las fases terminales sintomáticas. La infección de los linfocitos T *in vitro* induce la formación de sincitios y muerte celular (Pedersen y Barlough, 1991; Terwee y col., 2005).

1.3.5.3. Pruebas moleculares

La amplificación del ADN provírico por **PCR** presenta una serie de ventajas frente al diagnóstico serológico.

- Permite detectar la infección en animales que todavía no han seroconvertido o en aquellos en los que el sistema inmunitario ya está muy deprimido.
- Permite diferenciar si un cachorro seropositivo está infectado o presenta anticuerpos calostrales, eliminando la dificultad de interpretar el diagnóstico (Dunham y Graham, 2008).
- Permite utilizar diferentes tejidos, por lo que se puede hallar el virus en aquellos tejidos donde se pueda haber quedado acantonado.

Como inconveniente principal se encuentra la alta tasa de mutación de FIV, que sólo se puede salvar utilizando oligonucleótidos iniciadores que hibriden con zonas muy conservadas del provirus (Dunham y Graham, 2008; Hosie y col., 2009).

También se han propuesto técnicas de **RT-PCR** en las que se detecta directamente el virión y no su forma provírica (Vahlenkamp y col., 1996). Por último, la tecnología de **PCR a tiempo real** o cuantitativa (qPCR) permite cuantificar la cantidad de virus o provirus en sangre (Leutenegger y col., 1999b).

1.3.5.4. Protocolo diagnóstico e interpretación de los resultados

En el diagnóstico de FIV mediante la detección de anticuerpos pueden surgir falsos positivos y falsos negativos.

- Falsos positivos
 - a) Anticuerpos calostrales: en cachorros menores de seis meses (Barr, 1996; Dunham y Graham, 2008), por lo que será necesario repetir la prueba entre tres y seis meses más tarde. Aunque algunos clínicos consideran que el porcentaje es muy bajo, otros sin embargo consideran que puede alcanzar el 18-20% de los casos (Barr y col., 1991; Barr, 1996; Levy y col., 2008b).
 - b) Anticuerpos vacunales: en aquellos países donde se realice esta práctica (EE.UU.) los anticuerpos vacunales pueden interferir con las pruebas diagnósticas (Ardensen y Tyrrell, 2004; Levy y col., 2004; Dunham y Graham, 2008).
- Falsos negativos
 - a) Dado que el desarrollo de anticuerpos se produce entre las dos y las doce semanas post-infección (p.i.), puede falsearse el resultado durante este periodo, siendo conveniente reevaluar a los animales sospechosos 60 días después del posible contacto de riesgo (Levy y col., 2008b).
 - b) En algunos casos se producen anticuerpos de forma cíclica, apareciendo y desapareciendo a lo largo de la infección.
 - c) En las fases terminales de la enfermedad, o en animales inmunodeprimidos por otras causas (otras enfermedades, animales de edad avanzada) el título de anticuerpos va disminuyendo e incluso puede llegar a desaparecer (Pedersen y col., 1989).
 - d) En algunos casos se dan procesos de curso rápido, donde el gato muere sin ser capaz de desarrollar anticuerpos.

Ante una sospecha por un contacto de riesgo de infección será necesario esperar al menos dos semanas para detectar los anticuerpos. Cuando el resultado es negativo se recomienda repetir el análisis a las 8 semanas de haberse podido producir el contagio. Un resultado dudoso deberá ser reexaminado 6-12 semanas después para su confirmación. En cualquier caso, la detección directa del virus mediante PCR permite resolver estos problemas, siendo muy útil en criaderos o albergues.

1.3.6. Tratamiento de la inmunodeficiencia felina

Al igual que en FeLV, no existe tratamiento curativo para la infección por FIV. Actualmente, además de ir resolviendo los diferentes signos clínicos que aparecen en el desarrollo de la enfermedad mediante antibioterapia, quimioterapia, etc., se están utilizando los fármacos desarrollados para combatir al HIV debido a que son potencialmente útiles en el tratamiento de FIV, aunque muchos son tóxicos para los gatos o han resultado no eficaces (Levy y col., 2008b; Hosie y col., 2009). A día de hoy no hay estudios suficientes que permitan instaurar un protocolo general de tratamiento. El mecanismo de acción de las terapias antirretrovirales se basa en la inhibición de dos de las proteínas necesarias para la replicación vírica: la transcriptasa inversa y la proteasa.

El AZT o zidovudina (3'-azido-2'-deoxytimidina) es el antivírico más estudiado y que ofrece resultados más prometedores (Hart y Nolte, 1995; Bisset y col., 2002; Levy y col., 2008b). El tratamiento con este inhibidor de la transcriptasa inversa reduce los títulos de virus en el plasma, mejora el estado clínico e incrementa la calidad y la esperanza de vida del paciente (Sellon y Hartmann, 2008; Hosie y col., 2009). El hecho de que aparezcan efectos secundarios como vómitos, anorexia y, sobretodo, anemia ha reducido las expectativas de uso de este medicamento. Sin embargo, a día de hoy, su uso está restringido al ámbito hospitalario (Fuente: Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios) y no está autorizado para uso felino.

El nucleósido acíclico, 9-(3-fluoro-2-phosphonylmethoxypropyl) adenina (FPMPA) ha mostrado su eficacia en gatos infectados por FIV, en los que se produce una regresión de la estomatitis, mejora del estado general, incremento del cociente CD4/CD8 y descenso de los niveles províricos, sin la aparición de los efectos secundarios que se producían con el uso de 9-(2-fosfonilmetoxietil) adenina (PMEA) (Sellon y Hartmann, 2008).

Otro agente antiretrovírico estudiado ha sido la estampidina (STAMP), un nucleósido análogo de las pirimidinas, que disminuye la carga vírica sin la aparición de signos clínicos, salvo vómitos esporádicos, y sin alteraciones biopatológicas, a excepción de la elevación de la ALT en algunos gatos (Uckun y col., 2003).

AMD3100 pertenece a los inhibidores de entrada viral, actuando como antagonistas del receptor CXCR4 que permite la entrada del virus en el linfocito T. Aunque no está autorizado como antiviral, se ha demostrado que mejora los signos clínicos y reduce la carga viral (Hosie y col., 2009).

Aunque existen algunos estudios que demuestran que el uso de los inhibidores de la proteasa pueden resultar útiles para el tratamiento de FIV (Huitron-Resendiz y col., 2004), no existe ningún estudio que apoye que inhiban la replicación vírica o que potencien el efecto de otros fármacos. Al igual que en HIV, se recomienda el uso de terapia combinada; se considera que el uso de varios fármacos elimina las posibles mutaciones víricas y, por tanto, mejora el pronóstico del animal (Gobert y col., 1994; LaCasse y col., 1996; Medlin y col., 1996).

Además de los tratamientos antivíricos, también se han ensayado tratamientos inmunomoduladores.

- *Filgastrim (Factor de estimulación de colonias de granulocitos)*: es una citoquina recombinante humana que ha sido usada en las neutropenias agudas. Puede incrementar el número de neutrófilos, pero también incrementar la carga viral (Arai y col., 2000; Phillips y col., 2005; Hosie y col., 2009).
- *Insulina – Factor de crecimiento 1*: Incrementa el tamaño del timo y regenera su corteza, favorece la reposición de linfocitos T (Hosie y col., 2009).

Sin estudios o ensayos controlados en animales infectados naturalmente se han utilizado otros inmunomoduladores como Acemannan, Bacille Calmette-Guérin, Lactoferrina bovina, Dietilcarbamicina, Levamisol, *Propionibacterium acnes*, *Serratia marcescens*, Proteína A estafilocócica (Levy y col., 2008b).

Otra posibilidad terapéutica es el interferón (apartado 1.4.9.).

1.3.7. Inmunopprofilaxis

Debido a la semejanza de FIV con el virus del SIDA humano, se ha considerado un buen modelo para probar estrategias vacunales para el hombre (Dunham, 2006), por lo que se han intentado desarrollar vacunas inactivadas, de ADN, de subunidades y péptidos vacunales, y vacunas a base de vectores víricos y bacterianos, sin que se hayan obtenido resultados definitivos hasta la fecha (Sellon y Hartmann, 2008).

Actualmente, no se recomienda la vacunación para la inmunodeficiencia felina en la Unión Europea, y de hecho, sólo hay una vacuna comercializada en EE.UU. autorizada en el año 2002, y en Australia y Nueva Zelanda, en 2004 que no ha demostrado su eficacia frente a los virus europeos (Dunham y Graham, 2008).

Existen numerosos factores a tener en cuenta en el desarrollo de una vacuna frente a FIV: elección del inmunógeno adecuado, la vía de administración, la protección frente a los distintos tipos de FIV, y la posibilidad de diferenciar gatos vacunados de gatos infectados naturalmente (Sellon y Hartmann, 2008). Algunos aspectos son los siguientes:

- Protección frente a distintos aislados víricos: La alta tasa de mutación que se produce en estos virus da lugar a una gran variabilidad antigénica, no solo entre los distintos subtipos víricos (A, B, C, D y E), sino también entre aislados del mismo subtipo. Este hecho no permite obtener una buena protección frente a determinados virus, los cuales pueden escapar del sistema inmunitario (deriva antigénica) (Levy y col., 2008b). A pesar de esta variabilidad antigénica, sí que se ha observado inmunidad cruzada entre ciertos subtipos; por ejemplo, la primera vacuna comercial con aislados del subtipo A y D inactivados confería protección frente al subtipo B (Kusuhara y col., 2005; Pu y col., 2005; Dunham, 2006).
- Aumento de la infección después de la vacunación: Se ha descrito que en algunas ocasiones se produce un aumento en la susceptibilidad a FIV de los gatos vacunados (Giannecchini y col., 2002). Puede ser debido a: a) el incremento del número de células diana del virus, ya que la vacunación lleva implícita el desarrollo de la respuesta inmunitaria y, con ello, la expansión de linfocitos T; b) la expresión de receptores como CD134 y CXCR4 en los linfocitos T activados que facilitan la infección vírica; y c) el bloqueo de los receptores Fc o del complemento de la célula (Dunham, 2006).
- Diferenciación entre gatos infectados y gatos vacunados: Como se mencionó anteriormente el diagnóstico habitual de la inmunodeficiencia felina se basa en la detección de anticuerpos y no de antígeno, como ocurre con la leucemia felina. Por lo tanto, será necesario desarrollar un marcador antigénico o una técnica que nos permita distinguir gatos vacunados de infectados. En estos casos, sólo pruebas directas como el aislamiento vírico o la PCR serían útiles, pero no se usan de forma rutinaria en la clínica (Uhl y col., 2002; Dunham y Graham, 2008).

1.4. Interferón

1.4.1. Introducción histórica

Los interferones fueron los primeros antivirales descubiertos que interferían en la replicación vírica de las células de mamíferos (Gessani y col., 2014). En 1957, Alick Isaacs y Jean Lindenmann, del Instituto de Investigaciones Médicas de Londres, descubrieron el interferón. Estos investigadores cultivaron células corioalantoideas de embrión de pollo con virus influenza inactivado por radiaciones ultravioleta, y añadieron el sobrenadante obtenido de este cultivo a nuevas células corioalantoideas, pero infectadas con virus influenza vivo, observando que algún componente en el sobrenadante protegía de la nueva infección. A este componente lo llamaron interferón (IFN) (Isaacs y Lindenman, 1957). Posteriormente comprobaron que esta molécula tenía un efecto antivírico de amplio espectro (podía inhibir la infección de varios virus), y que además poseía características antiproliferativas (Gessani y col., 2014).

Debido a que la única fuente de interferón eran las donaciones de sangre, la cantidad de interferón era muy escasa y las investigaciones estuvieron bastante limitadas. Sin embargo, a partir de los años 80 la ingeniería genética, utilizando *E. coli*, permitió obtener cantidades ilimitadas, baratas y de gran pureza de este compuesto, de manera que su estudio se hizo más sencillo (Hartmann, 2014).

1.4.2. Naturaleza, tipos e importancia del interferón en la inmunidad

Los interferones están incluidos en la familia de las citoquinas que regulan la inmunidad en infecciones y tumores (Belardelli y col., 2002; Baldwin y col., 2004b). Son polipéptidos producidos por diversas células y con funciones pleiotrópicas, entre las que destacan su potente propiedad antiviral, sus funciones inmunorreguladoras, su capacidad antiproliferativa y su potencial antiinflamatorio (Decker y col., 2005; Theofilopoulos y col., 2005; Billiau, 2006; Ivashkiv y Donlin, 2014). Actualmente se clasifican en tres tipos (Gessani y col., 2014; Schneider y col., 2014) (Tabla 1.4.1.):

- Tipo I (IFN-I) o interferón vírico, que incluye IFN- α (o leucocítico), IFN- β (o fibroblástico), IFN- ω , IFN- τ (producido por los trofoblastos de rumiantes con un papel importante en la gestación, Martal y col., 1998), e IFN- δ (producido por trofoblastos de cerdos y con alta actividad antivírica). Otros interferones descritos son IFN- κ (kappa), IFN- ϵ (epsilon) e IFN- ζ (zeta). Multitud de células pueden secretar IFN- α /- β , pero las células dendríticas son las principales productoras de IFN- α , produciendo hasta 100 veces más que otros tipos celulares tras un desafío microbiano o fúngico (García y col., 2007; Schneider y col., 2014).
- Tipo II (IFN-II) o interferón inmune, que sólo incluye al IFN- γ . Es sintetizado por linfocitos T cooperadores o colaboradores, linfocitos T citotóxicos y células asesinas naturales (NK). Provoca una señal que juega un papel fundamental en el establecimiento de la inmunidad celular y además mejora la respuesta de los interferones tipo I (Young, 1996; Bach y col., 1997; Carrasco y Almendral del Río, 2006; Shneider y col., 2014).
- Tipo III (IFN-III), también conocidos como IFN- λ s (1-4), tiene una alta afinidad por el IFNLR1 que se sintetiza únicamente en las células epiteliales. La señal estimula la vía de las JAK-STAT e induce ISGs de igual modo que los IFN-I (ver 1.4.4.) (Sommereyns y col., 2008; Donnelly y Kolenko, 2010; Prokunina-Olsson y col., 2013; Bolen y col., 2014).

Tabla 1.4.1. Características y comparación de ambos tipos de interferón.

	Tipo I (IFN-I)	Tipo II (IFN-II)
Nombre	interferón vírico	interferón inmune
Tamaño	20 kDa	55 kDa
Secretado por	multitud de células	linfocitos LTh, LTc, y células NK
Subtipos	- α , - β , - ω , - τ , etc.	IFN- γ
Formación inducida por	infección vírica ARN de doble cadena	estimulación mitogénica o antigénica IL-12 e IL-18 de los macrófagos linfocitos Th1 o las células NK

Los interferones de tipo I inducen una respuesta antiproliferativa y antiviral, y no sólo juegan un papel importante en la respuesta innata, sino que también tienen influencia en la respuesta adaptativa. La maduración de las células dendríticas es importante para la estimulación de los linfocitos T (Saito y col., 2004; Gerlach y col., 2006). Además, los IFN tipo I aumentan la expresión de moléculas de clase I del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) en todas las células, lo que contribuye a la eliminación de las células infectadas (Andrieu y col., 2001).

El IFN- γ juega un papel importante en las respuestas innata y adaptativa (Boehm y col., 1997; Biron, 2001; Sen, 2001): por un lado contribuye a la presentación de antígenos, favoreciendo la respuesta citotóxica, y por otro activa los macrófagos. Además, modula la respuesta inmunitaria y participa en la diferenciación de linfocitos Th1 y Th2 (Biron, 2001; Sen, 2001; García y col., 2007).

1.4.3. Inducción de genes productores de interferón

El interferón es una proteína inducible, es decir, no se encuentra de forma constitutiva sino que necesita un estímulo para producirse (tales como virus, ARNbc, polipéptidos, citoquinas, mitógenos, etc.), salvo en las células del trofoectodermo del endometrio de los rumiantes (Carrasco y Almendral del Río, 2006).

La inducción de los interferones tipo I está regulada por dos vías de transducción de señales que se activan por los virus, la vía clásica y la de receptores TLRs (Haller y col., 2006; Uematsu y Akira, 2007; Alsharifi y col., 2008; Barber, 2011; Iwasaku, 2012; Paludan y Bowie, 2013):

- La mayoría de las células, incluyendo fibroblastos, hepatocitos y células dendríticas convencionales, utilizan la llamada vía clásica. Estas células tienen receptores citosólicos (RC) que son capaces de reconocer ácidos nucleicos virales dentro de las células. La presencia del ARNbc vírico y su unión con el receptor citosólico activa las rutas de NF- κ B y de IRF-3, factores de regulación de la transcripción del interferón. Estos factores se dirigen al núcleo y se unen al promotor del gen del IFN- β formando el complejo denominado “enhanceasoma”, al que se van a unir otros coactivadores y ARN polimerasa, produciéndose así su transcripción (Figura 1.4.1.). Como respuesta las células secretan inicialmente IFN- β .

En la siguiente fase de amplificación, el IFN- β , tras su unión con el receptor IFNAR, desencadena la expresión de IRF-7, principal regulador de la expresión de los genes del IFN de tipo I (Honda y col., 2005a y b) que, en cooperación con IRF-3, iniciará la síntesis de IFN- α (Figura 1.4.1.).

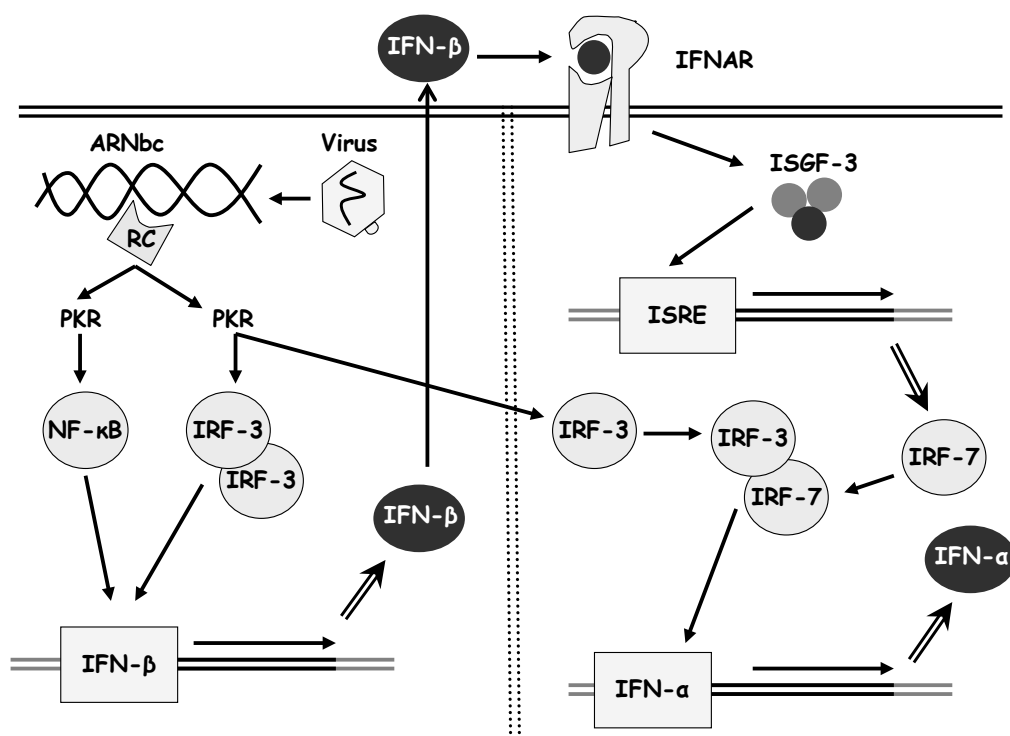


Figura 1.4.1. Mecanismo de inducción de genes de interferón

- Por el contrario, las células dendríticas plasmocitarias utilizan la vía de los receptores “Toll” (TLRs), expresados en la superficie celular o en los endosomas, que son sensibles al ADN y ARN vírico. La señal del TLR activa IRF-7, que se encuentra constitutivamente expresado en estas células (Kawai y Akira, 2011; Schneider y col., 2014), dando lugar a la secreción de altos niveles de IFN- α (Fitzgerald-Bocarsly y Feng, 2007) (Figura 1.4.2.).

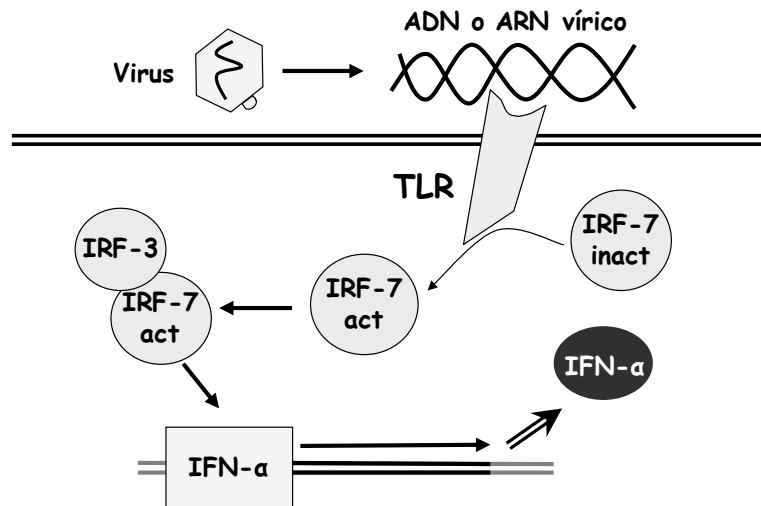


Figura 1.4.2. Mecanismo de inducción de genes de interferón en las células dendríticas

El IFN- γ se induce por la unión de los linfocitos con células presentadoras de antígeno. Los mecanismos de señal están poco caracterizados, pero implican a la proteína p38 y a la ruta de las MAP quinisas (MAPK). La producción se incrementa por IL-12 e IL-18, citoquinas secretadas por las propias células presentadoras de antígenos (Schoenborn y Wilson, 2007).

1.4.4. Genes y proteínas inducidos por interferón

Una de las características más importante de la señal producida por el interferón es su velocidad, porque no es necesaria la síntesis de nuevas proteínas debido a que todos los componentes de la cadena están ya presentes (Schneider y col., 2014).

En la membrana celular hay dos tipos de receptores de interferón (Bach y col., 1997): IFNAR, específico de IFN-I, e IFNGR, específico de IFN-II. Ambos están formados por dos subunidades: IFNAR-1 e IFNAR-2 e, IFNGR-1 e IFNGR-2, respectivamente (Ivashkiv y Donlin, 2014; Gessani y col., 2014; Schneider y col., 2014).

En ambos casos la unión del interferón al receptor conlleva la heterodimerización de las dos subunidades de las que está compuesto (Haan y col., 2006; van Boxel-Dezaire y col., 2006). Esta heterodimerización activa las proteínas JAK (*Janus Tirosín Quinasas*). Así, IFNAR activa las tirosinkinisas TYK-2 y JAK-1 e IFNGR a JAK-1 y JAK-2. La activación del elemento JAK produce la fosforilación de un factor de transcripción relacionado que se encuentra en el citoplasma, y que está implicado en la transducción de señales de varias moléculas, denominado factor de transcripción STAT (*Signal Transduction and Activator of Transcription*) (Bandyopadhyay y col., 1995; Levy y Darnell, 2002).

- Si la señal es por IFN- α o - β se fosforilarán las formas STAT-1 y STAT-2, las cuales se unirán a la proteína p48 (IRF-9), formando un trímero (ISGF-3) que se dirige al núcleo y se une a unas secuencia reguladoras del ADN que actúan *in cis*, llamados ISREs (*Interferon-Stimulated Response Elements*) en los genes inducibles por interferón (ISGs), con una secuencia consenso a/gNGAAANNGAAACT (Tsukahara y col., 2006; Ivashkiv y Donlin, 2014), muy similar al elemento IRF, cuya secuencia consenso está presente dentro de los promotores de IFN-I y de la mayoría de ISGs (Marsili y col., 2003).
- Si la señal es por IFN- γ se produce la fosforilación de STAT-1, que forma un homodímero que se dirige al núcleo donde se une a secuencias reguladoras del ADN, específicas para IFN- γ , conocidas como GAS (*Gamma Activation Sequence*) (Decker y col., 1997; Levy y Darnell, 2002; Schneider y col., 2014) con una secuencia consenso TTNNNNNAA (Figura 1.4.3.).

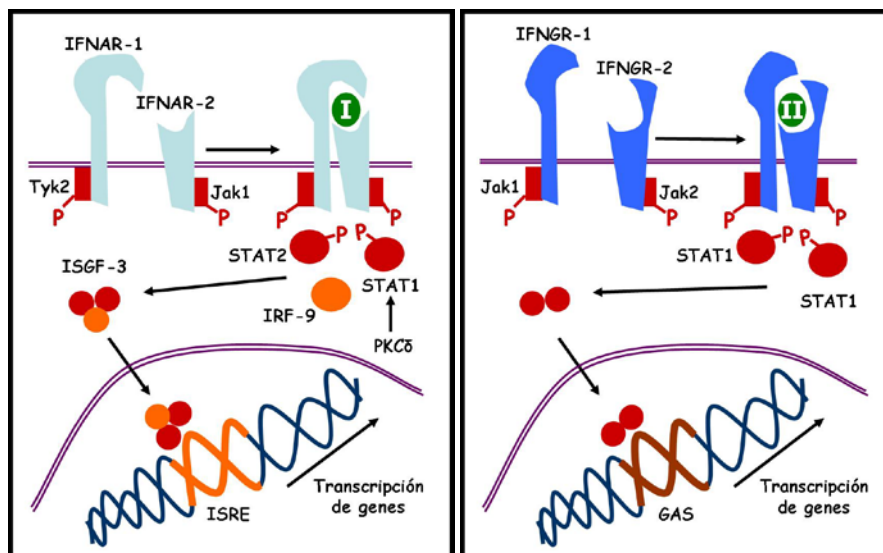


Figura 1.4.3. Mecanismo de inducción de genes por interferones tipo I y II.

Los diferentes tipos de interferón tienen una afinidad diferencial por el receptor y consecuentemente, se inducen genes y se sintetizan proteínas diferentes en cada caso, algunas de las cuales tienen actividad antiviral (Schneider y col., 2014). Estas proteínas implicadas en la respuesta antiviral pueden actuar utilizando tres vías principales: PKR (proteín quinasa-R), OAS (2',5'-oligoadenilato sintetasa) y proteínas Mx (Haller y col., 2006).

La PKR inhibe la traducción de proteínas víricas y activa la transcripción de citoquinas y la presentación antigénica por CMH de tipo I, aumentando la eficacia de la respuesta inmunitaria. La vía OAS activa la endorribonucleasa latente (ARNasa L), destruyendo el ARN vírico e inhibiendo de este modo la síntesis de proteínas. Por último, las proteínas Mx, con función GTPasa, interfieren en la replicación vírica inhibiendo el tráfico vesicular (impiden el transporte de la nucleocápsida) y la síntesis de ARN vírico (François y col., 2000; Goodbourn y col., 2000; Samuel, 2001).

Se han descrito otras rutas o sistemas activados o inhibidos por el interferón con actividad antiviral, como el sistema óxido nítrico sintetasa (Dalton y col., 1993) o la familia de proteínas p200 (Liu y col., 1999). Además, en la actualidad con los *microarrays* se están identificando otros genes cuya expresión se modifica por el interferón.

1.4.5. Actividad antiviral de los interferones tipo I

Los interferones fueron las primeras moléculas naturales reconocidas con actividad antiviral. Se ha observado que *in vitro* disminuyen los títulos víricos, y que *in vivo* reducen la viremia. El interferón no bloquea un paso específico del ciclo vírico sino que actúa en distintos puntos: en la entrada del virus, en la transcripción de ARNm, en la síntesis de proteínas víricas, en la replicación del genoma vírico, o en el ensamblaje y la formación de nuevos viriones o en la salida del virus. El punto de acción dependerá tanto del virus como del tipo de célula infectada, afectando normalmente a varias fases de la replicación vírica (Blanco y Orden, 2013; Schneider y col., 2014) (Figura 1.4.3.).

Aunque la sensibilidad de los distintos virus a la acción del IFN varía en función de la célula hospedadora, en general los virus ARN suelen ser más sensibles al IFN que los virus ADN. Parece que, en el caso de los virus ADN, el interferón inhibe la morfogénesis y la maduración, mientras que en los virus ARN el interferón actúa sobre la replicación del ARN vírico (Blanco y Orden, 2013).

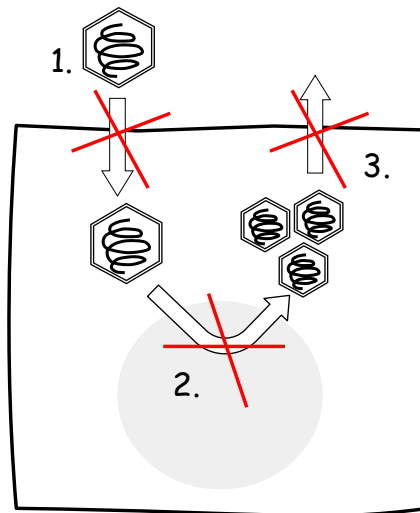


Figura 1.4.3. Acción antivírica del interferón. Siendo: (1.) Inhibición de la entrada del virus; (2.) Inhibición de la traslocación y replicación del virus; (3.) Inhibición de la salida del virus.

1.4.6. Actividad antitumoral de los interferones tipo I

El efecto antitumoral del interferón se puede ejercer de forma directa sobre las células tumorales, o indirecta sobre otras células implicadas en el crecimiento tumoral; tanto una como otra es producto de la regulación por parte del interferón de ciertos genes de expresión. Estos genes de expresión regulan los receptores de otras citoquinas, la concentración de proteínas de regulación en la superficie de células de la respuesta inmunitaria, y la activación de enzimas que regulan el crecimiento y la función celular. Por ello su alteración puede dar lugar a:

- **Efectos directos**

- Efecto antiproliferativo:** El IFN- α y el IFN- β bloquean la fase G1 del ciclo celular a través de un inhibidor de las ciclinas dependientes de quinasas (CDK). Además el IFN puede alargar el ciclo a través de otras proteínas de la familia p200 en todas las fases (G1, G2 y S) (Asefa y col., 2004; Ferrantini y col., 2007).
- Inducción de apoptosis:** Independientemente del tipo de interferón, la inducción de la apoptosis se produce a través de una señal de FADD/Caspasa-8 que activa la cascada de las caspasas, libera citocromo C en la mitocondria disminuyendo el potencial de membrana de la mitocondria, cambia la simetría de la membrana plasmática y fragmenta el ADN. Además, el uso de microarrays ha identificado 15 ISGs con funciones proapoptóticas entre los que se encuentra PKR, p53 y OAS. Sin embargo, probablemente ninguno de estos ISGs pueda, en solitario, inducir apoptosis y sea necesario un efecto acumulativo para llevarla a cabo (Barber, 2000; Chawla-Sarkar y col., 2003; Randall y Goodbourn, 2008).

- **Efectos indirectos**

- Inmunomodulación:** Los IFN pueden desarrollar su efecto antitumoral por la estimulación de linfocitos T citotóxicos, células NK y células dendríticas (DCs) (Basham y col., 1982; Kleinerman y col., 1986; Liu y col., 2001; Sato y col., 2001).
- Inhibición de la angiogénesis:** El crecimiento tumoral lleva asociado la formación de nuevos vasos; esta angiogénesis permite al tumor obtener la energía y las materias primas para su crecimiento. Los interferones pueden reducir el crecimiento tumoral inhibiendo la angiogénesis (Sidky y Borden, 1987; Dinney y col., 1998; Lindner, 2002). Se ha observado que el uso de terapia génica con IFN- β insertado en Adenovirus (Ad-m-IFN- β y Ad-hIFN- β) disminuye la formación de estos vasos y, por tanto, retrasa el crecimiento tumoral (Izawa y col., 2002).

1.4.7. Actividad proapoptótica de los interferones tipo I

Uno de los efectos de IFN en la célula es la inducción de apoptosis. La apoptosis juega un papel crítico en la diferenciación celular, en la eliminación de células con daño genético o que presentan una proliferación celular incontrolada, y también en la prevención de la replicación viral mediante la eliminación de células infectadas por virus (Chawla-Sarkar y col., 2003). El IFN utiliza diferentes vías y activa la expresión de genes que contribuyen a la apoptosis, de modo que las proteínas inducidas conducen a la muerte celular por apoptosis de células infectadas, lo que limita la propagación del virus de una célula a otra (Bekisz y col., 2010) (Figura 1.4.4).

Por ejemplo, la PKR regula la expresión de genes implicados en la apoptosis, posiblemente a través de la ruta de NF- κ B (Barber, 2000; Chawla-Sarkar y col., 2003; García y col., 2006). La inducción de TRAIL y/o Fas/FasL activa el dominio de muerte asociado Fas (FADD), que juega un papel importante en la apoptosis mediada por IFN. La activación de FADD activa, a través de la caspasa-8, la ruta de las caspasas que origina cambios en la simetría de la membrana plasmática, la escisión de PARP, la condensación de la cromatina, la fragmentación del ADN y la muerte celular (Chawla-Sarkar y col., 2003). Los efectos de la apoptosis inducida por el IFN no se limitan a las células infectadas por retrovirus sino que también puede explicar el agotamiento de los linfocitos T CD4⁺ en individuos HIV⁺ (apartado 1.4.10) (Herbeuval y Shearer, 2007; Mangino y col., 2007; Imbeault y col., 2009). El interferón puede activar las caspasas 4 y 8, las caspasas iniciadoras 8 y 9 y el efector de la caspasa 3 (Thyrell y col., 2002; Chawla-Sarkar y col., 2003), estimular los genes para la producción de p53, Bcl-2, Bak y Bax (Thyrell y col., 2002; Chawla-Sarkar y col., 2003) y activar PI3K (Uddin y col., 1997; Bekisz y col., 2010).

Los efectos de la apoptosis inducida por el IFN no se limitan a las células infectadas; por ejemplo, en el caso de los retrovirus es la responsable de la reducción del número de linfocitos T CD4⁺ (apartado 1.4.9) (Herbeuval y Shearer, 2007; Mangino y col., 2007; Imbeault y col., 2009).

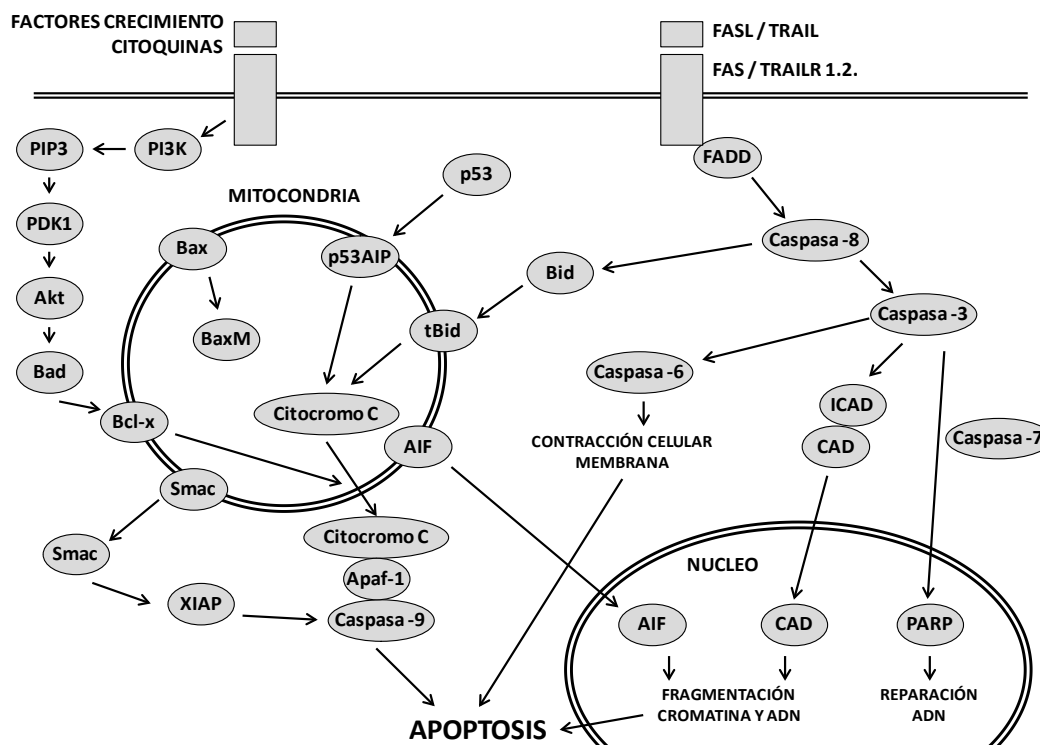


Figura 1.4.4. Cascada de señalización de la apoptosis.

1.4.8. Mecanismos de evasión de los virus frente a los efectos del Interferón Tipo I

Los virus han desarrollado diferentes sistemas que les permiten escapar de la respuesta antivírica inducida por IFN. Esta actividad anti-interferón puede producirse en tres momentos diferentes: en la síntesis del interferón, durante la señalización y afectando a las proteínas antivíricas inducidas por el interferón (Gómez-Lucia y col., 2009).

Algunas proteínas víricas son supresoras de genes de expresión de interferón a través de la inhibición general de los genes de transcripción del hospedador (Haller y col., 2006). Sin embargo, también algunos virus poseen sistemas específicos frente al interferón que pueden actuar a diferentes niveles (Feng y Partner, 2008; Randall y Goodbourn, 2008; Devasthanam y col., 2014). Se ha sugerido agruparlos en cuatro tipos según el punto sobre que el virus ejerce su inhibición (Taylor y Mossman, 2012):

1. evitar el reconocimiento del virus,
2. desactivando factores de transcripción,
3. bloqueando la señal a distintos niveles; en función del punto de bloqueo se pueden alterar las señales producidas por IFNs tanto de tipo I ($-\alpha$, $-\beta$) como de tipo II ($-\gamma$) y
4. impidiendo o inhibiendo la expresión o acción de las proteínas antivíricas inducidas por el interferón, principalmente a nivel de PKR (Figura 1.4.5.)

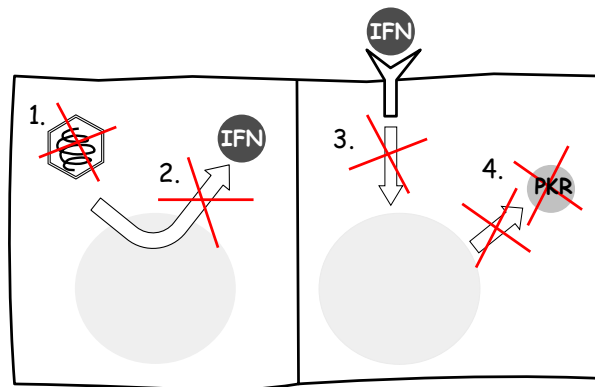


Figura 1.4.5. Mecanismos de evasión de los virus a la acción del interferón. Siendo: (1.) Evitar el reconocimiento viral; (2.) Desactivar factores transcripción; (3.) Bloquear la señal de IFN; (4.) Impedir o Inhibir la expresión o función de proteínas antivíricas inducidas por el IFN.

El mecanismo de inhibición de la acción del interferón de los retrovirus pertenece a la cuarta categoría, impidiendo la activación o inhibiendo la funcionalidad de las proteínas inducidas por el interferón, principalmente del sistema PKR.

- a) En los individuos infectados por HIV existe paralelamente un incremento de IFN y un progreso de la replicación viral y de la enfermedad. Esto es debido a que el virus cuenta con mecanismos que le permiten evadirse del efecto antiviral del interferón, bloqueando el sistema PKR, formando proteínas con una estructura similar a eIF-2, que compiten con la original por la unión con PK3, degradando la PKR e induciendo un inhibidor de la RNasaL. Esto permite la síntesis de proteínas víricas y la replicación viral (Endo-Munoz y col., 2005; Bolinger y col., 2009). Otras proteínas pueden tener un papel importante en la evasión del efector antiviral del IFN en HIV, entre otras Nef (Marsili y col., 2003; Quaranta y col., 2004; Short, 2009).
- b) HTLV deprime la expresión de algunos genes inducidos por el interferón, como por ejemplo las proteínas MxA, PKR y OAS. Por otro lado, los resultados parecen mostrar que HTLV-I no tiene efecto en la síntesis y fosforilación de las proteínas JAKs o STATs. Sin embargo, no se puede excluir que existan otras vías por las que HTLV-I reprima la señal de IFN (Feng y Ratner, 2008).

1.4.9. Efectos secundarios o colaterales del interferón en las células

In vitro, la proteína gp120 de HIV-1 en la membrana del linfocito T CD4⁺ infectado estimula la producción de interferón en las células dendríticas, que induce la expresión de TRAIL por los linfocitos T CD4⁺ infectados y no infectados (Herbeuval y col., 2005). Este mecanismo citotóxico y la estimulación de células NK (Vieillard y col., 2005) pueden ser responsables del alto grado de apoptosis de los linfocitos T CD4⁺ no infectados en pacientes HIV-1⁺ (Estaquier y col., 1994). Además se ha observado que el interferón puede aumentar la expresión de las moléculas de tipo I del CMH en la mayoría de los linfocitos T (Keir y col., 2002a), pudiendo dar lugar a la selección disfuncional de los linfocitos T CD8⁺ (Keir y col., 2002b). Algunos trabajos han sugerido efectos nocivos a altas concentraciones de IFN- α como inhibición de la proliferación de linfocitos T y de la producción de citoquinas.

Además se ha asociado la presencia de altas concentraciones de IFN a nivel local en el sistema nervioso central con el desencadenamiento de demencia. La infección por algunos retrovirus puede suponer alteraciones del sistema nervioso central. En estos animales se ha observado que los niveles de IFN- α se incrementan en el fluido cerebroespinal correlacionados con los déficits cognitivos (Sas y col., 2007 y 2009). El uso de anticuerpos neutralizantes de IFN- α mejoró significativamente la función cognitiva, disminuyó la microgliosis y evitó la pérdida de arborización dendrítica en el cerebro en los ratones infectados con HIV (Severa y Fitzgerald, 2007). Según algunos estudios realizados, la activación de STAT1 juega un papel crucial en daño cerebral y la neuropatogénesis inducidas HIV-1 (Chaudhuri y col., 2008).

1.4.10. Papel y uso del interferón en retrovirosis

1.4.10.1. El interferón en las infecciones retrovirales

La mayoría de los datos con respecto al papel del IFN-I en las infecciones retrovirales proceden de estudios realizados en HIV. El incremento de la concentración de IFN- α en el suero de los pacientes con sarcoma de Kaposi y hemofilia fue una de las primeras anomalías inmunológicas descubiertas en pacientes con HIV-SIDA (Eyster y col., 1983).

En HIV los datos parecen señalar el papel importante del IFN- α en la patogenia de la infección. Sin embargo, el efecto concreto del IFN es difícil de establecer, ya que pueden estar involucrados diferentes factores a diferentes niveles en el sistema inmunitario. En las primeras etapas de la infección por HIV, cuando el sistema inmunitario es capaz de inhibir la infección del virus, la síntesis de IFN-I es normal. Sin embargo, en la primera etapa de la fase progresiva se ha observado una reducción de la producción de IFN- α , acompañada por la disminución en la población de linfocitos T CD4⁺, pudiéndose utilizar la concentración de interferón como un marcador adicional para determinar la etapa y evolución del HIV.

En los individuos HIV⁺ asintomáticos y con HIV no progresores se han descrito niveles elevados de IFN- α (Soumelis y col., 2001), correlacionado con mayores niveles de linfocitos T CD4⁺, baja carga viral y ausencia de infecciones oportunistas (Feldman y col., 2001; Soumelis y col., 2001; Finke y col., 2004). En estos casos, los altos niveles de IFN- α pueden desempeñar un papel protector en la progresión del HIV/SIDA.

Se han observado resultados similares en la infección por el virus de la leucemia murina de Friend (F-MuLV) y HTLV-I. Se han descrito diferencias significativas en la expresión viral de HTLV-I entre ratones tipo salvajes y ratones knockout IRF-7, deficientes en la respuesta de IFN-I (Kinpara y col., 2009). Además, en los ratones infectados y tratados de forma temprana con IFN-I, las cargas virales en el bazo y plasma fueron significativamente más bajas que en los ratones no tratados (Gerlach y col., 2006). Todo ello sugiere que el IFN es capaz de controlar, en cierto grado, las infecciones tanto por HTLV como por F-MuLV.

En etapas más avanzadas, las concentraciones séricas de IFN- α son más elevadas, coincidiendo con un incremento de la antigenemia, viremia y de las infecciones oportunistas (Tilton y col., 2006 y 2008). La disminución de la eficacia del IFN en la evolución de la infección retroviral puede ser debida a varios factores,

siendo uno de ellos el desarrollo de clones de retrovirus resistentes a IFN. Los estudios sobre la sensibilidad a IFN de HIV aislado de pacientes en diversas fases de la infección han mostrado una amplia gama de sensibilidades a IFN- α 2, alta en los aislados de pacientes asintomáticos y notablemente menor una vez que la infección por HIV ha progresado a SIDA, cuando los niveles séricos de IFN- α son más altos. En las fases más avanzadas, las elevadas concentraciones de IFN- α podrían promover la resistencia o selección de aquellas variantes resistentes. Además, las infecciones oportunistas pueden estimular la síntesis de IFN-I, que conduciría a una mayor tolerancia y resistencia al IFN (Künzi y col., 1995; Karpov, 2001).

1.4.10.2. El tratamiento con interferón en las infecciones retrovirales

Se ha observado que la administración de IFN-I a individuos infectados con HIV (Herbeuval, 2006), FeLV (Zeidner y col., 1990a y b; Collado y col., 2007), FIV (de Mari y col., 2004; Pedretti y col., 2006), HTLV-I (Feng y col., 2003), BLV (Kiermer y col., 1998) o MuLV (Gerlach y col., 2006) ha mejorado la sintomatología y reducido los signos clínicos.

El IFN tiene un efecto inhibitor de la infección en linfocitos T y monocitos cuando se administra en el momento de la infección por HIV, no detectándose antígeno p24 o actividad RT, ARN o ADN víricos (Shirazi y Pitha, 1993; Agy y col., 2004). En el caso de FeLV se evidenció que alfa-interferón recombinante humano (rHuIFN- α) inhibía la replicación vírica en cultivos de células felinas en mayor medida cuando se añadía un día después de la inoculación vírica que cuando se aplicaba antes de la infección de células (Jameson y Essex, 1983).

Existen ciertas discrepancias en cuanto a la fase del ciclo que se ve afectada por el IFN. En las infecciones *in novo* (es decir, células que están infectadas para el experimento), el efecto de IFN-I puede afectar a las primeras etapas del ciclo, mientras que en las infecciones crónicas (células o líneas celulares primarias que ya están infectadas), el IFN puede inhibir la replicación y etapas posteriores (Shirazi y Pitha, 1992; Dianzani y col., 1998).

El IFN- α inhibe eficazmente el primer ciclo de replicación del HIV-1 por la disminución de los niveles de ARN y proteínas en las células. Los niveles de ADN proviral integrado fueron significativamente más bajos en las células tratadas con IFN- α , lo que sugiere que el efecto de IFN- α era tanto sobre la formación de ADN proviral como sobre su integración (Shirazi y Pitha, 1993). En el caso de SIV, el efecto del interferón se produce entre la unión del virus a la célula y la transcripción inversa, ya que la concentración de ARNm viral disminuye notablemente cuando se trata con IFN, lo que no ha sido observado en HIV (Taylor y col., 1998).

Sin embargo, la mayoría de los estudios han demostrado que la síntesis de proteínas no se ve afectada por el IFN-I. Los niveles de antígeno p24 del HIV permanecen inalterados en el sobrenadante después de tratar las células infectadas con IFN-I (revisado en Collado y col., 2009). Los análisis de radioinmunoprecipitación de lisados de linfocitos T HIV⁺ tratados con IFN muestran que se produce un fracaso en la formación de partículas víricas, lo que fue confirmado por microscopía electrónica (Dianzani y col., 1998). En HTLV-I el tratamiento con IFN- α o IFN- β , modificaba la expresión de las proteínas víricas tales como gp46 (SU) pero no p19 (MA), p24 (CA), p28, p36 y GP68 (Oka y col., 1990; Gabriele y Ozato, 2007). Los estudios con microscopía electrónica han revelado que algunas de las partículas HTLV-I en las células tratadas con altas dosis de IFN-I están atrapadas en las vacuolas intracelulares (Oka y col., 1990). Estos resultados sugieren que el IFN de tipo I no inhibe la síntesis proteica pero reprime el procesamiento o ensamblaje de las proteínas y/o liberación de los viriones en la fase tardía de la maduración.

En el caso de la infección por el virus de la leucemia murina de Moloney (MoMuLV) se demostró que el IFN ejerció un efecto inhibitor significativo en la glucosilación de las proteínas Env, que puede conducir a la producción de viriones no infecciosos defectuosos (Aboud y col., 1981a y b). Sin embargo, la mayoría de las observaciones recientes sugieren que el IFN puede afectar a la virogénesis mediante la modificación de la post-translocación de las proteínas de Gag que impiden el procesamiento de la poliproteína de la cápsida (Feng y col., 2003; Okumura y col., 2006; Feng y col., 2008). Además, las partículas quedarían adheridas a la

célula no logrando madurar y formar cores condensados (Babé y col., 1997). En estudios de HTLV-I se observa que IFN- α impide que las proteínas Gag puedan asociarse con las balsas lipídicas, afectando de este modo al montaje del virus y bloqueando su replicación (Feng y col., 2003). No se conoce exactamente si se debe a una alteración de los lípidos o de las proteínas o del ambiente de las balsas, a su acción sobre los chaperonas o por una modificación de las proteínas Gag (Marchetti y col., 2006; Feng y col., 2008).

También hay mecanismos en los que están implicados genes y proteínas inducidos por IFN: la OAS y Mx inhiben la formación de partículas virales, reducen la actividad RT de HIV-1 y la síntesis de p24 (Smith y col., 1991; Shirazi y Pintha, 1992; Baca-Regen y col., 1994). El factor intracelular que inhibe la replicación retroviral, APOBEC3G/F, se estimula por IFN- α en las células infectadas, lo que resulta en una mayor actividad antiviral contra HIV, SIV o MuLV (Wang y col., 2008).

1.4.11. Aplicaciones del interferón en Retrovirosis Felinas

Debido a su capacidad antivírica e inmunomoduladora los interferones han sido empleados desde hace un tiempo en la terapéutica de pequeños animales. El IFN- α está autorizado para su uso en leucemias, papilomatosis e infecciones por HIV en humanos, aplicado por vía tópica, nasal, ocular o intralesional. Inicialmente el empleo de IFN- α en medicina veterinaria fue intuitivo, por extrapolación de los buenos resultados obtenidos en medicina humana; sin embargo, actualmente ya hay varios estudios publicados que demuestran su utilidad en medicina felina.

Actualmente, el IFN- α se emplea en gatos para tratar diversos procesos, tales como infecciones por *Herpesvirus*, *Coronavirus*, *Parvovirus*, *Papillomavirus*, Peritonitis infecciosa felina (Paltrinieri y col., 2007; Hartmann, 2012). Actúa como una citoquina con efectos inmunomoduladores pero también tiene efectos antivirales directos.

Debido a las posibilidades terapéuticas del interferón en las retrovirosis felinas se han realizado varios estudios con diferentes protocolos y vías de administración (oral y subcutánea). Sin embargo, se ha observado que en la administración parenteral de rHuIFN- α se forman anticuerpos neutralizantes que hacen que el tratamiento sea refractario después de 3 -7 semanas (Zeidner y col., 1990a; Hartmann, 2012). El interferón puede administrarse vía oral durante un periodo más largo de tiempo porque no se desarrollan estos anticuerpos.

El IFN- α se inactiva por los ácidos del estómago y por la tripsina y otras enzimas del duodeno, por lo que no puede ser absorbido y detectado en la sangre después del tratamiento por vía oral. Sin embargo, podría tener un efecto a nivel local, estimulando el tejido linfóide oral y faríngeo que desencadenaría una cascada inmunitaria que finalmente tendría un efecto sistémico (Cantell y Pyhälä, 1973; Koech y Obel, 1990; Hartmann, 2012). Así mismo, el interferón induce la respuesta de citoquinas a nivel local, aumentando la expresión de IFN- α y reduciendo la de IL-4 (Tompkins, 1990). Con respecto a la dosis, no se han observado diferencias significativas entre administrar dosis altas o bajas de IFN- α (Cowgill, 1995).

En un principio, los ensayos estaban dirigidos a utilizar el rHuIFN- α , el único disponible en el mercado hasta entonces. Hasta el momento existe discrepancia en su utilidad en el tratamiento de infecciones por FeLV y FIV.

Se observó que el tratamiento con rHuIFN- α disminuía la mortalidad de gatos con infección natural (Cotter, 1979) o experimental (Cummins y col., 1988) por FeLV, aunque en este último caso no se observó reducción de la viremia. Posteriormente, se ha descrito que el cuadro clínico y las alteraciones laboratoriales del gato mejoraban con el tratamiento con rHuIFN- α (Steed, 1987; Weiss y col., 1991), además de disminuir la antigenemia de los gatos infectados por FeLV (Zeidner y col., 1990). También se han obtenido resultados positivos combinándolos con otros antivirales, como el 3'-azido-2',3'-dideoxymidina (AZT) que redujo la antigenemia (Stuetzer y col., 2013). Sin embargo, en otros estudios no han observado evidencias de mejora en los signos clínicos, la analítica o la viremia (Kociba y col., 1995; Kölbl y col., 2000; McCaw y col., 2001; Hartmann y col., 2002).

Son muy pocos los estudios publicados con gatos infectados por FIV y tratados con rHuIFN- α . En el año 2006 en un ensayo con un grupo de gatos infectados con signos clínicos de enfermedad, se observó que el interferón mejoraba el estado general de los gatos y su condición corporal, que los linfocitos T CD4⁺ aumentaban su supervivencia y que se producía un lento pero progresivo incremento de CD8⁺; sin embargo, no se observaron diferencias significativas a nivel vírico y provírico (Pedretti y col., 2006).

El interferón omega recombinante felino (rFeIFN- ω) es un producto recombinante que se obtiene al infectar gusanos de seda con un baculovirus que contiene la secuencia del IFN. El rFeIFN- ω , a diferencia del rHuIFN- α , no estimula la producción de anticuerpos al administrarse por vía parenteral a los gatos, y por tanto no se produce el efecto refractario, manteniendo las características antivirales, antitumorales y antiproliferativas. A partir de su síntesis y comercialización, la mayoría de los estudios se centraron en su aplicación en medicina felina. Se han realizado estudios para su uso en el tratamiento de *Herpesvirus*, *Coronavirus*, Peritonitis infecciosa felina y Panleucopenia felina (Greene, 2012).

Las retrovirosis felinas no han sido una excepción, aunque a día de hoy no existe un número representativo de estudios que demuestre su eficacia. En un estudio con gatos infectados por FIV no se observaron cambios significativos en la supervivencia de los gatos tratados con rFeIFN- ω , aunque sí se observaron mejoras en la condición clínica (Maynard y col., 2000). En gatos infectados por FeLV o coinfectados por FeLV/FIV tratados con rFeIFN- ω se observó una disminución de mortalidad y una mejora de las alteraciones de la serie blanca; sin embargo, no se produjo evolución positiva de la serie roja (De Mari y col., 2004). Otro estudio no encontró diferencias significativas entre el grupo de animales tratados y no tratados en parámetros como concentración de provirus, linfocitos T CD4⁺ o leucocitos en sangre (Caney, 2005).

Estudios más recientes con rFeIFN- ω han reportado una mejoría inespecífica y general del estado clínico de gatos infectados por FeLV o FIV, pero con resultados contradictorios o no definitivos sobre la evolución de la carga vírica o de los parámetros bioquímicos o inmunológicos en los gatos tratados (Domenech y col., 2011; Hennes y col., 2011; Lutz y col., 2009; Gil y col., 2013 y 2014).

JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

La leucemia y la inmunodeficiencia felinas siguen siendo a día de hoy dos patologías que suponen un reto importante en la clínica diaria a pesar de las campañas de vacunación y control que se están llevando a cabo y que han reducido significativamente su prevalencia e incidencia. La reducción del número de casos se ha complementado por una mayor sensibilidad en el bienestar y el mantenimiento de la salud de los animales de compañía. Esta circunstancia obliga a buscar herramientas terapéuticas para estas enfermedades felinas crónicas.

Los retrovirus tienen como característica diferencial la capacidad de transformar su ARN en ADN e insertarse en el genoma de la célula hospedadora. Esta capacidad les permite escapar del sistema inmunitario y permanecer “latentes” durante largos periodos. En ambos casos el virus establece infecciones latentes persistentes en la médula ósea, dando como resultado inmunosupresión, neoplasias, etc.

Precisamente, es debido al ciclo viral y el establecimiento de latencia lo que imposibilita, con el conocimiento actual, una curación total de la enfermedad. Además, en el caso de la inmunodeficiencia felina tampoco existen vacunas eficaces para su prevención.

En el tratamiento de enfermedades crónicas de los animales de compañía debe tenerse en cuenta, además de la eficacia del tratamiento, que exista un equilibrio entre eficacia y los efectos adversos, que los tratamientos a administrar utilicen preferentemente la vía oral para reducir al máximo el manejo y permitir al propietario un fácil uso y que tengan un coste asumible en el largo plazo, para asegurar un máximo cumplimiento.

La falta de herramientas terapéuticas específicas está obligando a los veterinarios a utilizar, en muchas ocasiones de forma empírica antivíricos e inmunomoduladores, alentados por los resultados positivos obtenidos con el virus de la inmunodeficiencia humana. Entre estos inmunomoduladores se encuentra un IFN- α 2a recombinante humano, registrado para medicina humana y utilizado en personas HIV⁺. Este IFN- α humano ofrece la ventaja de su fácil aplicación (vía oral) y su bajo coste, lo que hace que sea una alternativa muy interesante al uso del rFeIFN- ω (Virbagen®), que se aplica por vía subcutánea y resulta un tratamiento caro para los propietarios. Sin embargo, hay pocos estudios que hayan analizado su eficacia al aplicarse como tratamiento de infecciones por retrovirus felinos.

A tenor de todo lo anteriormente expuesto, se propuso como objetivo general de este trabajo estudiar el efecto del IFN- α sobre la evolución clínica, parámetros biopatológicos y víricos en el tratamiento de las retrovirosis felinas por FeLV y FIV. Este objetivo se llevó a cabo desarrollando tres objetivos parciales.

1. **Analizar el efecto *in vitro*** sobre la expresión vírica, la actividad retrotranscriptasa RT, la viabilidad celular, la apoptosis y el ARN vírico del IFN- α 2a recombinante humano, el IFN- α (A/D) recombinante humano, y el IFN- ω recombinante felino en cultivos celulares linfoides infectados por FeLV y FIV.
2. **Estudiar la situación inicial** clínica, analítica y de la infección vírica de una población de gatos con infección natural por FeLV o FIV, para determinar las alteraciones y correlaciones significativas en ambas infecciones.
3. **Evaluar la evolución** de la situación clínica, analítica y de la infección vírica en la población de gatos con infección natural por FeLV o FIV indicados en el objetivo anterior tras aplicar un tratamiento de IFN- α 2a recombinante humano administrado por vía oral.

MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. Estudios *in vitro*

3.1.1. Interferones

Se utilizaron tres productos comerciales de interferón:

- Interferón alfa 2a recombinante humano, rHuIFN α (2a), registrado para medicina humana como Roferon® (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania).
- Interferón alfa (A/D) recombinante humano, rHuIFN α (A/D) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, Estados Unidos). Solamente utilizado en los experimentos de FeLV.
- Interferón omega recombinante felino, rFeIFN- ω , registrado en medicina veterinaria como Virbagen Omega® (Virbac, Carros, Francia).

Para los estudios *in vitro* se realizaron diluciones decimales seriadas en el medio de cultivo celular (RPMI 1640) (apartado 3.1.2.), empleándose el siguiente rango de concentraciones:

- Estudios con FeLV: entre 30 y 300.000 UI/ml para rHuIFN α (2a), entre 20 y 200.000 U/ml para rFeIFN- ω y entre 0,4 y 400 UI/ml para rHuIFN α (A/D).
- Estudios con FIV: se disminuyó la concentración de rHuIFN α (2a) y rFeIFN- ω a 15-150.000 UI/ml.

3.1.2. Líneas celulares y mantenimiento de los cultivos

En los experimentos *in vitro* se utilizaron tres líneas celulares que crecen en suspensión.

- FL74-UCD-1 (ATCC-CRL-8012) (FL74): Linfoblastos T crónicamente infectados por el virus de la leucemia felina (subtipos FeLV-A, -B y -C), procedente de un linfoma renal de un gato inoculado con este virus (cedida por el Dr. M. Horzinek de la Universidad de Utrecht, Holanda) (Theilen y col., 1969).
- U937 (ATCC CRL-1593.2): Linfoblastos humanos procedentes de la efusión pleural de un individuo con un linfoma histiocítico humano (cedida por el Dr. M. Essex de la Universidad de Harvard, EE.UU.).
- FeTJ (ATCC CRL-11967): Linfocitos T de sangre periférica independientes de IL12, obtenidas de un gato libre de patógenos (SPF), no infectadas pero susceptibles de infectarse por FIV (amablemente cedido por el Dr. Willet de la Universidad de Glasgow, Reino Unido).

Las células se incubaron a 37°C en atmósfera con 5% CO₂ y 95% de humedad. El medio de cultivo utilizado fue RPMI 1640 (PAA Laboratorios GMBH, Pasching, Austria) suplementado con L-glutamina (Sigma-Aldrich), penicilina-estreptomina (BioMedia, Boussens, Francia) y suero fetal bovino (SFB) inactivado por tratamiento a 56°C durante 30 min (FCS, BioMedia). Al medio de cultivo de las células FeTJ se añadió 2-mercaptoetanol y HEPES (Medio de Cultivo Completo).

Las células se subdividían dos veces por semana.

Medio de cultivo completo

- RPMI 1640
- 2mM L-glutamina
- 100 UI/ml penicilina
- 100 µg/ml estreptomina
- 10% suero fetal bovino
- 50 µM 2-mercaptoetanol (para FeTJ)
- 50 µM HEPES (para FeTJ)

3.1.3. Virus empleados y titulación de FIV_{GL8}

Los experimentos *in vitro* se realizaron con dos virus:

- Virus de la leucemia felina (FeLV): Se utilizó el virus que infecta crónicamente a la línea celular FL74, mencionada anteriormente.
- Virus de la inmunodeficiencia felina (FIV): Se utilizó la cepa FIV_{GL8}, cedida por el Dr. Brian Willett (Retrovirus Research Laboratory, Universidad de Glasgow, Reino Unido).

En el caso de FIV_{GL8} fue necesario calcular el TCID₅₀, o dosis vírica en la cual el 50% de los cultivos inoculados presentan efecto citopático (Payment y Trudel, 1993). Se cultivaron células FeTJ en placas de 24 pocillos (Iwaki Glass Co., Funahashi, Japón) (2×10^5 células por pocillo) con diez diluciones dobles seriadas de sobrenadante infectado, cada una por triplicado. Tras seis días de incubación fueron examinadas por microscopía óptica en una cámara de Thoma con tripán azul (0,8 mM) en una proporción 1:1, considerando como efecto citopático cuando más del 50% de las células del pocillo no eran viables. El título del “stock” vírico se determinó aplicando la fórmula de Reed y Muench (Payment y Trudel, 1993), expresándose como TCID₅₀/ml.

3.1.4. Condiciones experimentales de los cultivos

Debido a que la línea celular FeTJ no está infectada, antes de la incubación con interferón fue necesaria la infección de las células con FIV_{GL8}. Para ello se incubaron 1×10^7 células FeTJ en Medio Completo de Cultivo en un Falcon T75 con 10^2 TCID₅₀/ml de FIV_{GL8} en un volumen final de 15 ml. Tras 24h de incubación se procedió a tratar con el interferón, siguiendo el protocolo descrito a continuación.

Para el ensayo tanto con FL74 como con FeTJ- FIV_{GL8} se utilizaron placas de 24 pocillos (Iwaki Glass Co.), en los que se resuspendieron 2×10^5 células/pocillo en 0,5 ml de medio. Seguidamente, las células se incubaban con 0,5 ml de la dilución de interferón correspondiente durante 24, 48 y 72 h. Antes de realizar cada experimento se contaron las células y se estimó la viabilidad celular con Tripán azul (apartado 3.1.3.). Solamente se utilizaron aquellos cultivos con una viabilidad superior al 95%.

En todos los experimentos se incluyeron células no infectadas (U937 o FeTJ) manteniéndolas en las mismas condiciones de cultivo, pero tratadas con interferón, como control del efecto del interferón en ausencia de infección, así como controles de las células infectadas sin tratar con interferón. Todos los ensayos se realizaron por triplicado y fueron repetidos en tres ocasiones independientes.

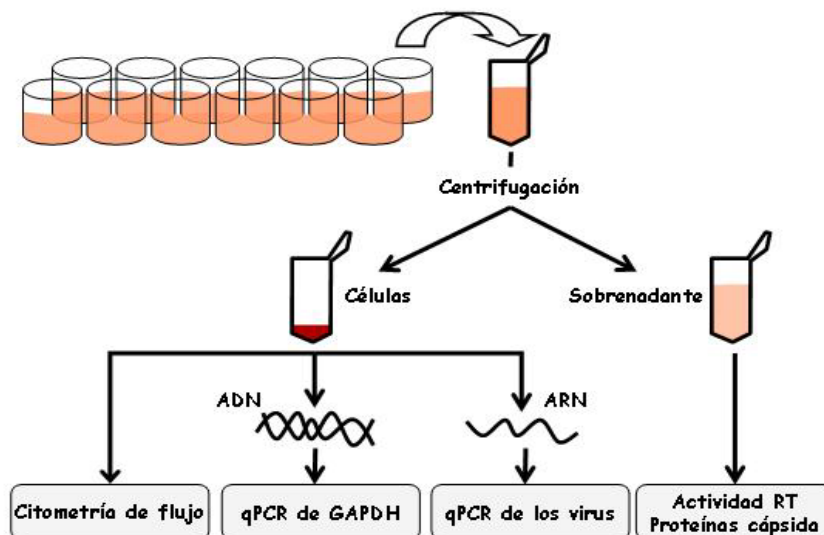


Figura 3.1.1. Esquema del desarrollo experimental de los experimentos *in vitro*.

Una vez transcurridas 24, 48 y 72 h de incubación, el contenido de los pocillos se pipeteó repetidamente para dispersar homogéneamente las células, distribuyéndolo en tres tubos Eppendorf, que fueron centrifugados a 2.000 rpm (450xg) durante 5 min (Laborzentrifugen 3K10, Sigma), obteniéndose (Figura 3.1.1.):

- Sobrenadante: se conservó a -80°C hasta realizar las mediciones de proteína vírica (p24 y p27) (apartado 3.1.6.) y de actividad retrotranscriptasa (apartado 3.1.7.).

- Sedimento celular: se utilizó con tres fines distintos:
 - a) determinar la viabilidad de las poblaciones mediante citometría de flujo (apartado 3.1.5.),
 - b) extraer el ADN cromosómico para realizar la PCR a tiempo real del GAPDH, empleado como gen de expresión estable (apartados 3.1.8. y 3.1.10.) y
 - c) extraer el ARN para realizar la PCR a tiempo real de cada uno de los virus (apartados 3.1.9. y 3.1.10.).

3.1.5. Análisis de viabilidad celular y apoptosis por citometría de flujo

Tras centrifugar el contenido de los pocillos incubados con y sin interferón (apartado 3.1.4.), el sedimento de uno de los tres tubos Eppendorf se lavó dos veces con PBS estéril (PAA Laboratories GmbH), centrifugando a 2.000 rpm (450xg) durante 5 min (Laborzentrifugen 3K10, Sigma).

Las células se resuspendieron en 100 μ l de tampón de incubación con 0,8 μ l de anexina V-Fluos (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania) y 1 μ l de 50 μ g/ml de ioduro de propidio (IP) (Sigma-Aldrich), e incubaron durante 15 minutos a 4°C en oscuridad.

Tampón de incubación

- 10 mM HEPES/NaOH pH 7,4
- 140 mM NaCl
- 5 mM CaCl₂

Se determinaron las poblaciones de células vivas no apoptóticas (IP-/anexina-), apoptóticas tempranas (IP-/anexina+), y necróticas y apoptóticas tardías (IP+/anexina+) mediante citometría de flujo en el Centro de Apoyo a la Investigación (CAI) de Microscopía Electrónica Luis Brú de la Universidad Complutense de Madrid. Se utilizó el citómetro FACScalibur (Becton Dickinson Biosciences, San Diego, CA, EE.UU.) con un espectro de excitación de 488 nm y filtros de detección de 515 nm y 585 nm. El porcentaje celular se calculó sobre 10⁴ células. Como controles de marcaje se utilizaron células incubadas sin IP ni anexina, células incubadas sólo con IP y células incubadas solamente con anexina.

La concentración citotóxica (CC₅₀) del interferón fue determinada por ajuste de los datos a una curva de concentración frente a viabilidad y determinando el punto correspondiente al 50% del efecto.

3.1.6. Determinación de las proteínas de la cápsida, p27 de FeLV y p24 de FIV

Para la determinación de p27 de FeLV y p24 de FIV se utilizaron los tests comerciales PetChek FeLV[®] Antigen Test y PetChek FIV[®] Antigen Test (Idexx Laboratories Inc., Westbrook, ME, EE.UU.), respectivamente, basados en un ELISA tipo “sándwich”. En ambos casos, los pocillos están tapizados con anticuerpos específicos frente a su correspondiente proteína vírica. Tras añadir la muestra y el conjugado (anticuerpos anti-p27 o anti-p24 conjugados con peroxidasa) se incubó 5 min a temperatura ambiente. Tras lavar, se añadía el sustrato y se observaba desarrollo de color en los casos positivos (Figura 3.1.2.). Su intensidad se midió con un espectrofotómetro (Tecan Spectra-Fluor A-5082, Crailsheim, Alemania) a 405 nm. Cada muestra se determinó por triplicado y se calculó la media aritmética. La concentración de p27 se cuantificó por comparación con una curva estándar patrón entre 0,001 y 10 μ g/ μ l de p27 purificada (USBiological, Swampscott, MA, EE.UU.).

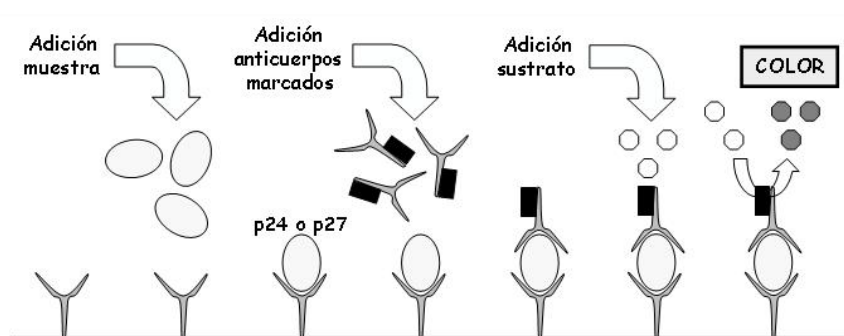


Figura 3.1.2. Esquema del desarrollo del ELISA tipo “sándwich” en el que se basa PetChek[®].

Se analizaron los sobrenadantes de FL74 y U937 (PetChek FeLV[®] Antigen Test), y de FeTJ infectados con FIV_{GL8} y no infectados (PetChek FIV[®] Antigen Test) diluidos 1:4 con 0,9% de solución salina estéril.

3.1.7. Determinación de la actividad retrotranscriptasa (RT)

La actividad RT se determinó mediante los test comerciales C-type-RT[™] Activity Assay para FeLV y Lenti-RT[™] Activity Assay para FIV (Cavidi Tech, Uppsala, Suecia), siguiendo las indicaciones del fabricante. Estos test están diseñados para cuantificar la actividad RT de Retrovirus tipo C y Lentivirus, respectivamente. Para ello emplea un sistema en dos fases sin marcaje radiactivo: los sobrenadantes acelulares (10 µl) se incubaron con 50 µl de “mezcla de RT” durante 3 horas a 33°C. Durante este tiempo, la actividad RT en la muestra sintetiza una cadena de ADN complementaria a la que tapiza la placa; esta nueva cadena incorpora en su secuencia el oligonucleótido bromo-deoxiuridina trifosfato (BrdUTP). En la segunda fase se añaden anticuerpos anti-BrdU conjugados con fosfatasa alcalina de modo que, al actuar sobre el sustrato, se produce una reacción colorimétrica medible en el espectrofotómetro a 405 nm (Tecan Spectra-Fluor A-5082), proporcional a la actividad RT. La concentración de RT del sobrenadante se estimó por comparación con una curva patrón generada con el estándar proporcionado en el propio test. Además de los controles positivos y negativos incluidos en el kit, los sobrenadantes de las líneas U937 y FeTJ (no infectadas) se utilizaron como control negativo.

La actividad RT se determinó en los sobrenadantes de FL74 y U937 (C-type-RT[™] Activity Assay), FeTJ infectados con FIV_{GL8} y no infectados (Lenti-RT[™] Activity Assay).

La concentración inhibitoria 50 (IC₅₀) del interferón fue determinada por ajuste de los datos a una curva de concentración frente a actividad RT y determinando el punto correspondiente al 50% del efecto máximo.

3.1.8. Extracción de ADN cromosómico

El ADN cromosómico (empleado para cuantificar la expresión de GAPDH mediante PCR a tiempo real) se extrajo a partir de las células de uno de los tubos Eppendorf (apartado 3.1.4.), para lo cual se resuspendieron en 500 µl del tampón de extracción de ADN.

Tras mezclarlo y agitarlo con el vórtex, se mantuvo en hielo durante 30 minutos. A continuación se centrifugó a 4.000 rpm (1.300xg) durante 8 min (Hermle Labortechnik GmbH, Wehingen, Alemania). Se trasladó el sobrenadante a otro tubo y se añadió 250 µl de fenol y 250 µl de cloroformo:alcohol isoamílico (CIA). Tras mezclar y centrifugar a 14.000 rpm (16.000xg) durante 3 minutos, se trasladaba la fase superior a otro tubo y se volvía a mezclar con 500 µl de CIA, para centrifugar de nuevo a 14.000 rpm durante 3 minutos. Se trasladaba de nuevo la fase superior a otro tubo y se añadía 500 µl de isopropanol frío (-20°C) (Sigma) invirtiendo el tubo repetidamente para precipitar el ADN. Después de centrifugar a 14.000 rpm durante 3 minutos, y decantar el sobrenadante, se añadía 1 ml de etanol (Sigma) al 70% (-20°C) invirtiendo el tubo, centrifugando y decantando como antes. El sedimento obtenido se dejaba secar hasta que todo el alcohol se evaporaba, resuspendiéndolo en 100 µl de agua MilliQ estéril, manteniéndose durante 30 min a temperatura ambiente antes de congelar a -20°C hasta su posterior utilización.

Tampón de extracción de ADN

- 200 mM Tris.HCl, pH 7,5
- 250 mM NaCl
- 25 mM EDTA
- 0,5% SDS

3.1.9. Extracción de ARN de las células y obtención de ADN complementario (ADNc)

Para extraer el ARN (para analizar la expresión de los virus) se utilizó el sistema Trizol[®] Reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE.UU.) Las células del tercer tubo Eppendorf (apartado 3.1.4.) se resuspendían en 100 µl de PBS

a los que se añadía 900 µl del reactivo Trizol. Esta mezcla se incubaba 5 min a temperatura ambiente. A continuación, se añadía 200 µl de cloroformo (Sigma), se agitaba con el vórtex y se incubaba durante 10 min a temperatura ambiente. Tras centrifugar a 4°C durante 15 minutos a 10.000 rpm (8.000xg) se retiraba la fase superior y se mezclaba con 500 µl de isopropanol a -20°C (Sigma), incubando a temperatura ambiente y centrifugando a 4°C durante 10 minutos a 14.000 rpm (16.000xg). El sedimento se lavaba con 500 µl de etanol (Sigma) al 75% a -20°C como en el apartado anterior, resuspendiendo el sedimento en 40 µl de agua bidestilada estéril, y congelando el ARN a -80°C hasta su uso posterior.

Para evitar la contaminación con el provirus que está integrado en el ADN celular, se procedía a eliminar mediante la enzima DNasa los restos de ADN de la muestra. Para ello, se utilizaba el sistema RNase-Free DNase Set (Qiagen, Chatsworth, CA, EE.UU.). Las muestras de ARN obtenidas (20 µl) se trataban con 30.000 unidades de DNasa a 25°C durante 10 min, siguiendo el protocolo del fabricante. Posteriormente, y con el objeto de eliminar los restos de enzima, la muestra se trataba térmicamente a 65°C durante 10 minutos.

Antes de realizar la PCR a tiempo real o cuantitativa (qPCR), se transformaba el ARN extraído en ADN complementario (ADNc), utilizando el kit comercial SuperScript™ III First-Strand (Invitrogen). La concentración de ARN en las muestras se cuantificaba mediante un espectrofotómetro (BioPhotometer, Eppendorf, Hamburgo, Alemania). En las reacciones se incubaban 2,5 µg de ARN con los oligo(dT)₂₀ y dNTPs siguiendo las instrucciones del fabricante. El proceso de retrotranscripción se producía a 50°C con la intermediación de 4 U de enzima retrotranscriptasa. El ADNc se conservaba a -80°C hasta su uso.

3.1.10. Cuantificación del ARN vírico mediante PCR a tiempo real

La cuantificación del ARN vírico de las muestras se realizó mediante PCR a tiempo real (qPCR) a partir del ADNc obtenido. Se utilizaron dos pares de oligonucleótidos iniciadores y dos sondas marcadas con fluorescencia (Leutenegger y col., 1999; Pinches y col., 2006) (Tabla 3.1.1.).

La mezcla de reacción contenía 6 mM de MgCl₂, 0,2 µM de los oligonucleótidos iniciadores, 0,2 µM de la sonda fluorescente y 1 U de ADN polimerasa Platinum. Todos los reactivos se adquirieron a Biotools, excepto los oligonucleótidos iniciadores y la sonda con fluorescencia (Genosys-Sigma).

Mezcla de qPCR para FeLV y FIV

- Agua MilliQ libre de DNasa y RNasa
- Tampón de reacción 10x
- 6 mM de MgCl₂
- 40 µM de dNTPs
- 0,2 µM oligonucleótidos iniciadores
- 0,2 µM de sonda con fluorescencia
- 1 U de ADN polimerasa Plati-num/25 µl de reacción
- 12% v/v de muestra (ADNc)

En este tipo de PCR los oligonucleótidos iniciadores y la sonda se unen al ADN y se inicia la duplicación de la banda; cuando ésta llega al lugar donde se ha unido la sonda, se escinde la sonda y emite fluorescencia, que es captada y medida por el termociclador. La intensidad es proporcional al número de copias presentes. Se utilizaron los programas de PCR descritos en la Tabla 3.1.2.), empleando el termociclador Mx3000P (Stratagene, La Jolla, CA, EE.UU.). La medición de fluorescencia se realizaba tras la fase de elongación con los filtros de fluorescencia de Cy5 (649-666 nm) para FeLV, y FAM (492-517 nm) para FIV. Se calculó el ciclo umbral y se realizó la comparación entre ellos para estimar la existencia o no de diferencias significativas entre las diferentes concentraciones de interferón utilizadas.

3.1.11. Análisis estadístico de los experimentos *in vitro*

Para determinar la significación de los datos se realizó el ANOVA y el Test de Duncan mediante la aplicación informática SPSS 14.0. Se marcaron intervalos de confianza de al menos el 95% ($\alpha < 0,05$).

Tabla 3.1.1. Oligonucleótidos iniciadores de la PCR a tiempo real para FeLV y FIV, y tamaño del fragmento amplificado (Leutenegger y col., 1999; Pinches y col., 2006).

Oligonucleótido iniciador	Secuencia	Tamaño (pb)
FeLV 226 for	5'-TCCCCAGTTGACCAGAGTTC-3'	101
FeLV 326 rev	5'-GATGGCTCGTTTTATAGCAGAAAG-3'	
FeLV 272 sonda	5'-Cy5-AATCCCCATGCCTCTCGTTCTGTA-3BHQ3-3'	
FIV 551 for	5'-GCCTTCTCTGCAAATTTAACACCT-3'	121
FIV671 rev	5'-GATCATATTCTGCTGTCAATTGCTTT-3'	
FIV581 sonda	5'-FAM-CATGGCCACATTAATAATGGCCGCA-TAMRA-3'	

Tabla 3.1.2. Programa de la PCR a tiempo real de FeLV y FIV.

FeLV		
Fase	Temperatura	Tiempo
1	95°C	15 min.
2	94°C	1 min.
	51°C	1 min.
	72°C	3 min.
	40 ciclos	
3	72°C	10 min.

FIV		
Fase	Temperatura	Tiempo
1	94°C	15 min.
2	95°C	30 seg.
	64°C	1 min.
	72°C	1 min.
	40 ciclos	
3	72°C	10 min.

3.2. Estudios *in vivo*

3.2.1. Población de estudio

Los gatos incluidos en el estudio procedían tanto de propietarios como de colectividades felinas. En ambos casos, eran atendidos en una de las clínicas veterinarias privadas asociadas al proyecto o en la Consulta de Patología Infecciosa y Parasitaria del Hospital Clínico Veterinario de la Facultad de Veterinaria de Madrid. La exploración clínica, la toma de muestras, la administración del tratamiento y los seguimientos de todos los casos fueron realizados por los veterinarios responsables de cada una de las clínicas.

La edad de los animales estaba comprendida entre los seis meses y los doce años; pertenecían a diversas razas (mayoritariamente Común Europeo), y eran de ambos sexos, castrados y no castrados, con o sin signos clínicos evidentes de infección (Tabla 4.2.1. y 4.2.2.).

El criterio de inclusión fue el resultado positivo al test serológico Snap Combo Plus (Idexx Laboratories Inc., Westbrook, ME, EE.UU.), que detecta p27 de FeLV y anticuerpos anti-p24 de FIV, y que permitió realizar un cribaje inicial de la población que era atendida en las clínicas veterinarias. En el caso de FIV, se confirmó el diagnóstico por PCR para descartar los falsos positivos.

En el estudio no se incluyeron: gatas preñadas, gatos de difícil manejo, con neoplasias, en fase terminal de la enfermedad, coinfectados FeLV-FIV, o con otras enfermedades.

Previo a la inclusión en el estudio, los propietarios eran informados sobre el tratamiento y expresaban por escrito su consentimiento para que el gato fuera incluido en el mismo (Anexo III). Una vez firmado el consentimiento, a cada uno de los gatos se le asignó un número, se rellenó un formulario de incorporación (Anexo I) y se realizó su reseña correspondiente (Anexo II).

3.2.2. Manejo, alojamiento y alimentación de los animales

La inclusión en el estudio exigía que los animales no fueran tratados durante el mismo con otros fármacos inmunoestimulantes o inmunodepresores (corticoesteroides, etc.), que se realizara una administración competente del tratamiento y mantener al gato en ayunas (12 horas) previo a la extracción de sangre. No se exigieron otras medidas salvo las propias que la ética profesional impone, asegurando en todo caso el bienestar animal.

3.2.3. División en grupos de los gatos

Los gatos se dividieron en cuatro grupos dependiendo de los resultados de la exploración clínica y de la analítica sanguínea (apartado 3.2.5.) antes de iniciar el tratamiento.

- Grupo 0: Sin alteraciones clínicas ni biopatológicas.
- Grupo 1: Sin alteraciones clínicas pero con alteraciones biopatológicas.
- Grupo 2: Con alteraciones clínicas y biopatológicas, siendo la puntuación clínica igual o menor a 5.
- Grupo 3: Con alteraciones clínicas y biopatológicas, siendo la puntuación clínica igual o mayor a 6.

3.2.4. Tratamiento con interferón y pauta de administración

Se utilizó Roferon® (Roche Diagnostics, rHuIFN- α (2a): El vial comercial con 6×10^6 UI/ml se diluía en solución salina estéril hasta 60 UI/ml, haciendo alícuotas de 1 ml en tubos Eppendorf que se conservaban a 4°C durante el tratamiento. Cada uno de los viales de 60 UI de interferón se administraba con la comida o directamente en la boca, diariamente en semanas alternas durante cuatro meses. El tratamiento por tanto incluyó un total de 56 viales.

3.2.5. Toma de muestras

En el caso del estudio del Roferon® se establecieron cuatro visitas que se correspondieron con: el inicio del tratamiento (V0), en el mes 2 ó mitad de tratamiento (V1), en el mes 4 ó final del tratamiento (V2) y de cuatro a ocho meses después del final del tratamiento (V3). Debido a la dificultad de mantener las fechas exactas de visita, se dio un margen de 15 días antes o después de la fecha prevista para que el dueño llevara al gato a consulta durante las V1 y V2 (Figura 3.2.1.).

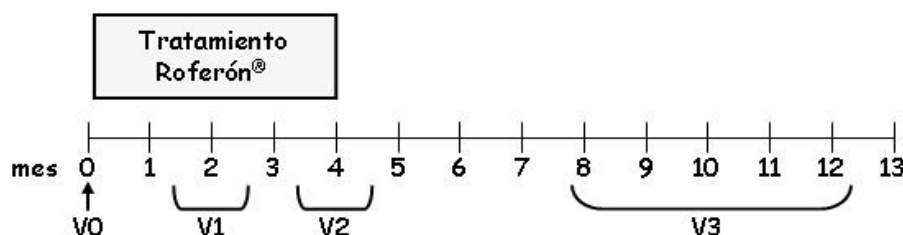


Figura 3.2.1. Cronograma de tratamiento y toma de muestras (V) en gatos tratados con Roferon® (rHuIFN- α (2a)). El tratamiento se administró diariamente en semanas alternas durante 4 meses.

En cada una de las visitas, en primer lugar, se procedía a la exploración clínica del gato, prestando atención a los parámetros relacionados con la infección retroviral, y se cumplimentaba la ficha clínica (Anexo II), para posteriormente realizar una valoración clínica numérica, siguiendo la puntuación que se muestra en la Tabla 3.2.1.

Tabla 3.2.1. Signos clínicos y su puntuación clínica, teniendo en cuenta las patologías más frecuentes asociadas a la infección por retrovirus, así como su valoración relativa (0, nada; 1, escasa; 2, mucha).

SIGNOS CLÍNICOS	PUNTUACIÓN CLÍNICA		
	0	1	2
Disorexia	No	Disorexia	Anorexia
Astenia	No	Leve-decaído	Marcada-postrado
Deshidratación	No	<10%	>10%
Deterioro condición corporal	Bien	Delgado	Esquelético
Linfoadenomegalia	No		Sí
Alteración de mucosas	No	Sí	
Polidipsia/ Poliuria	No	Sí	
Conjuntivitis	No		Sí
Queratitis	No		Sí
Lesiones orales	No		Sí
Alteraciones digestivas	No	Sí	
Lesiones cutáneas	No	Prurito, alopecia	Úlceras
Alteraciones respiratorias	No	Leves	Graves
Alteraciones neurológicas	No		Sí
Linfoma	No		Sí
Enfermedad mieloproliferativa	No		Sí
Otros tumores	No		Sí
PUNTUACIÓN MÁXIMA = 31			

Posteriormente se procedía a la extracción de 2 ml de sangre periférica de la vena cefálica o la yugular, según la manejabilidad del gato. Si el gato se encontraba excesivamente estresado se le tranquilizaba previamente con Medetomidina (Domtor[®], Pfizer Salud Animal S.A., Madrid, España), evitando así que el animal sufriera de forma innecesaria y que los valores hematológicos se vieran alterados ("leucograma de estrés"). La sangre extraída se transfería a dos tubos: uno con EDTA y otro con heparina-litio. Las muestras eran enviadas, en contenedores especiales, protegidas debidamente de la luz y refrigeradas, al Departamento de Sanidad Animal de la Facultad de Veterinaria de Madrid, donde se recibían en un plazo no superior a 24 horas tras la extracción.

3.2.6. Procesamiento de las muestras

En el momento de recibir la muestra se procedía a su registro en el cuaderno de recogida donde se le asignaba un código alfanumérico a cada muestra, que correspondía al número del gato más el número de Visita (por ejemplo, para el gato nº3 y la Visita dos el código sería 03V2), y se señalaban las posibles incidencias que surgían. Tras ello, se realizaba por un lado, el análisis visual de la muestra (hemólisis, coagulación, escasez de muestra, etc.) y, por otro, la distribución en alícuotas de ambos tubos para optimizar al máximo la muestra y poder realizar el mayor número de análisis (Figura 3.2.2.).

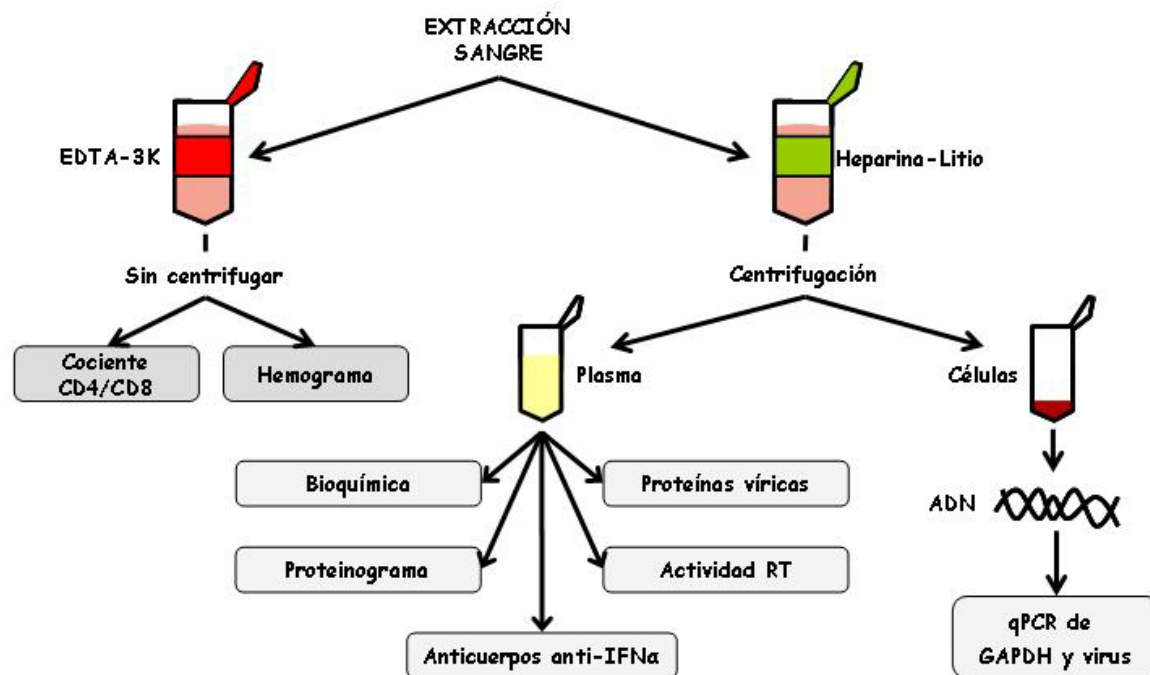


Figura 3.2.2. Distribución en alícuotas de las muestras de sangre extraídas de los gatos incluidos en el estudio. Los recuadros sombreados corresponden a análisis realizados en ≤ 24 h tras la extracción.

- Tubo de EDTA-3K (Tapval[®], Monlab, Barcelona, España): se subdividía en dos tubos, uno de ellos para realizar el hemograma (apartado 3.2.7.) y el otro para determinar el cociente CD4/CD8 mediante citometría de flujo (apartado 3.2.9.). Ambas pruebas se realizaban dentro de las 24h posteriores a extracción. El tubo se desechaba cuando presentaba hemólisis o coágulos.
- Tubo de heparina-litio: se procedía a su centrifugación a 1.500 rpm (400xg) durante 10 minutos (Sorvall RT 6000D, DuPont, Wilmington, DE, EE.UU.). De esta manera se obtenía:
 - a) Plasma: que se subdividía en dos tubos Eppendorf. Uno de ellos se enviaba al Laboratorio de Biopatología del Hospital Clínico Veterinario donde se realizaba el análisis bioquímico (apartado 3.2.7.) y el proteinograma (apartado 3.2.8.); con el otro se procedía al análisis de las proteínas víricas (apartado 3.2.11.), de la actividad retrotranscriptasa (apartado 3.2.12.) y la presencia de anticuerpos anti-IFN- α (apartado 3.2.10.). El análisis bioquímico se realizó dentro de las 24 h posteriores a la extracción; sin embargo, para el resto de análisis se conservó la muestra a -20°C hasta el momento de su procesamiento.
 - b) Células: a partir de las cuales se realizaba la extracción de ADN (apartado 3.2.13.).

3.2.7. Hemograma y perfil bioquímico

Estas pruebas se realizaron en el Laboratorio de Biopatología del Hospital Clínico Veterinario de la Facultad de Veterinaria de Madrid (Universidad Complutense) (HCV) con la colaboración y asistencia técnica de las Dras. Elena Escolar y Sonsoles Martín, y Dña. Ana Angulo.

El hemograma se determinó automáticamente (Sysmex F-800 Microcellcounter, Sysmex Corp., Kobe, Japón), utilizando uno de los tubos de sangre con EDTA. La fórmula leucocitaria se calculó manualmente en frotis sanguíneos, utilizando la tinción de Romanowsky. Los valores de referencia manejados para el hemograma se muestran en la Tabla 3.2.2.

Tabla 3.2.2. Valores de referencia establecidos en el Laboratorio de Biopatología del HCV para los parámetros del hemograma analizados en el estudio (Willard y col., 1999).

Parámetro	Valor de referencia
Serie roja	
Hematocrito	26 - 45 %
Glóbulos rojos	5 – 10 x10 ⁶ células/ μ l
Hemoglobina	8 – 15 g/dl
VCM	39 – 55 fl
HCM	12,5 – 17,5 pg
CCMH	30 – 36 g/dl
Serie blanca	
Leucocitos	5,5 – 19,5 x10 ³ células/ μ l
Neutrófilos	2.500-12.500 células/ μ l
Linfocitos	1.500 – 7.700 células/ μ l
Monocitos	0 - 850 células/ μ l
Eosinófilos	0 – 1.500 células/ μ l
Basófilos	5,5 – 19,5 células/ μ l

A partir del plasma se cuantificaron los valores bioquímicos, urea, creatinina, alanina aminotransferasa (ALT) y proteínas totales, utilizando el analizador de química seca Reflotron (Boehringer-Mannheim, Mannheim, Alemania). Los valores de referencia manejados para el perfil bioquímico se muestran en la Tabla 3.2.3.

Tabla 3.2.3. Valores de referencia establecidos en el Laboratorio de Biopatología del HCV para los parámetros bioquímicos analizados en el estudio (Willard y col., 1999).

Parámetro	Valor de referencia
Urea	38 - 71 mg/dl
Creatinina	0,7 - 1,8 mg/dl
ALT	30 - 100 UI/L

3.2.8. Separación de las proteínas plasmáticas por electroforesis (Proteinograma)

Esta prueba se realizó en el Laboratorio de Biopatología del HCV. Se introducían previamente las tiras de acetato de celulosa donde se realizaría la electroforesis en Tampón Veronal, pH 8,6. Tras la inmersión se secaban entre láminas de papel de filtro para eliminar el exceso de tampón. Tras este secado las muestras de plasma se aplicaban en la zona media del papel. Se introducían las tiras con el plasma en un tanque de electroforesis (BioSystems, Atom, Barcelona, España) y se sometían a un voltaje

Tampón Veronal pH 8,6

- ácido dietilbarbitúrico 3,12 g/l
- dietilbarbiturato sódico 17,1 g/l

constante de 200 V y 3,5 mA durante 35 minutos. Posteriormente, las tiras se teñían con negro-amido durante 10 minutos, eliminando el exceso de tinte mediante lavados con solución de metanol:ácido acético (47,5%:5%). Por último, una vez secadas las tiras se escaneaban con el densitómetro (Helena Optiscan, Helena Laboratories, Beaumont, TX, EE.UU.). Los valores de referencia se muestran en la Tabla 3.2.4.

Tabla 3.2.4. Valores de referencia establecidos en el Laboratorio de Biopatología del HCV para el proteinograma (Willard y col., 1999).

Parámetro	Valor de referencia
Proteínas totales	5,7 – 7,9 g/dl
Albúmina	2,3 – 4,0 g/dl
α -globulinas	0,5 – 1,5 g/dl
β -globulinas	0,6 – 1,9 g/dl
γ -globulinas	0,5 – 1,5 g/dl
Albúminas/globulinas	0,7 – 1,3

3.2.9. Determinación del cociente CD4/CD8 mediante citometría de flujo

El cociente de linfocitos T CD4/CD8 se determinó mediante el marcaje con anticuerpos monoclonales anti-CD4 felino conjugados a fluoresceína, y anti-CD8 felino conjugados a rodamina (Southern Biotechnology Associates Inc., Birmingham, AL, EE.UU.).

En primer lugar, y con el objetivo de lisar los eritrocitos, se trataban 250 μ l de cada una de las muestras de sangre con EDTA con 6 ml de tampón de lisis eritrocitario comercial (BD FACS Lysing Solution, Becton Dickinson Biosciences) durante 3 min, tras lo que se centrifugaba la muestra a 1.000 rpm (150xg) durante 5 min (Sorvall RT 6000D).

A continuación, el sedimento de leucocitos se lavaba dos veces con PBS (PAA Laboratories GmbH) y se resuspendía en 80 μ l de PBS, distribuyéndose en dos tubos Eppendorf, añadiendo 2 μ l de cada tipo de anticuerpo monoclonal a uno de ellos, y utilizando el otro tubo como blanco. Se incubaban durante 30 min en hielo y oscuridad, y se añadía 400 μ l de PBS y 50 μ l de solución fijadora (Cell-Fix, Becton Dickinson Biosciences).

Solución fijadora

- 1% formaldehído
- 0,1% azida sódica

La muestra se analizaba en el citómetro de flujo (Becton Dickinson FAC-Scan, Becton Dickinson Biosciences) del Centro de Apoyo a la Investigación (CAI) de Microscopía Electrónica Luis Brú de la Universidad Complutense de Madrid. El cociente se consideró alterado cuando fue inferior a 0,9.

3.2.10. Determinación de anticuerpos anti-IFN- α

La presencia de anticuerpos anti-IFN- α se determinó mediante un sistema ELISA comercial (Bender MedSystemsTM, Viena, Austria), utilizado en medicina humana para detectar la formación de estos anticuerpos durante la administración de IFN- α , en el que las placas de ELISA están tapizadas con IFN- α recombinante. Se añadían diluciones 1:5 de plasma en tampón comercial incluido en el kit. En caso de existir anticuerpos específicos, éstos quedaban unidos a la proteína de los pocillos. Tras incubar dos horas se lavaba y se añadía el conjugado (proteínas de interferón marcadas con peroxidasa). La reacción positiva se evidenciaba tras la adición del sustrato, cuantificando la intensidad de color en un espectrofotómetro a 450 nm (Tecan Spectra-Fluor A-5082).

3.2.11. Determinación de las proteínas de la cápsida p27 de FeLV y p24 de FIV

Para la determinación de p27 de FeLV y p24 de FIV se utilizaron los tests comerciales PetChek FeLV[®] Antigen Test y PetChek FIV[®] Antigen Test (Idexx Laboratories Inc.), respectivamente, tal y como se ha descrito en el apartado 3.1.6. El plasma de los gatos a estudiar (apartado 3.2.6.), fue previamente diluido a la mitad en solución salina. Su intensidad se midió con un espectrofotómetro (Tecan Spectra-Fluor A-5082, Crailsheim, Alemania) a 405 nm. Una variación de $\pm 20\%$ de la lectura inicial se consideró como empeoramiento o mejoría, respectivamente.

3.2.12. Determinación de la actividad retrotranscriptasa (RT)

La actividad RT se determinó en el plasma de los gatos a estudiar (apartado 3.2.6.) mediante los test comerciales C-type-RTTM Activity Assay para FeLV y Lenti-RTTM Activity Assay para FIV (Cavidi Tech, Uppsala, Suecia), siguiendo las indicaciones del fabricante (apartado 3.1.7.). Una variación de $\pm 20\%$ de la lectura inicial se consideró como empeoramiento o mejoría, respectivamente.

3.2.13. Extracción de ADN cromosómico de las muestras

El sedimento celular obtenido tras centrifugar la muestra de sangre heparinizada se resuspendió en 200 μ l de PBS, a partir del cual se procedió a la extracción de ADN mediante el kit DNeasy Tissue Kit (Qiagen), siguiendo las instrucciones del fabricante. El ADN extraído se almacenó a -20°C hasta su posterior utilización.

3.2.14. Determinación de la presencia de ADN proviral de FeLV y FIV por PCR

Para realizar el diagnóstico de la presencia de provirus en sangre circulante se utilizó la PCR anidada (en dos fases) diseñada en nuestro laboratorio para la detección conjunta de la secuencias de la región *pol* de ambos virus (Arjona y col., 2007).

En la primera reacción de PCR se usaron un par de oligonucleótidos iniciadores o cebadores con bases degeneradas que permiten la amplificación conjunta de dos fragmentos de distinto tamaño, de 1325 pb para FIV, y de 490 pb en FeLV (Tabla 3.2.5.). La segunda reacción de PCR (realizada con una dilución 1:10 del producto de la primera) utiliza dos pares de oligonucleótidos iniciadores, ya específicos de cada uno de los virus, y que dan lugar a dos bandas de distinto tamaño: 1138 pb en FIV y 306 pb en FeLV (Tabla 3.2.5.).

Tabla 3.2.5. Oligonucleótidos iniciadores de la PCR doble anidada para FeLV y FIV, y tamaño del fragmento amplificado (Arjona y col., 2007).

Virus amplificado	Oligonucleótido iniciador	Dirección	Secuencia	Tamaño (pb)
FeLV FIV	FF1	sentido	5'-AMCCRTTATTRGGRAGAG-3'	FIV: 1325
	FF2	antisentido	5'-CAMAGYAGCATGGATRTM-3'	FeLV: 490
FIV	FI5	sentido	5'-CAATGGCCATTAAATGAA-3'	1138
	FI4	antisentido	5'-AGAGAGGCCTGGAATCAAAT-3'	
FeLV	FE7	sentido	5'-GAAAGTACACAAAAACAGGAG-3'	306
	FE4	antisentido	5'-CTTAAGTCCTGCACTGG-3'	

Las reacciones se llevaron a cabo en una solución de agua MilliQ libre de DNasa y RNasa (Sigma), con tampón de reacción con 2mM de $MgCl_2$ (Biotools, Madrid, España), 0,4 mM de cada uno de los oligonucleótidos iniciadores (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ, EE.UU.) y 1U de ADN polimerasa recombinante (de *Thermus*) (Biotools). Como muestra se utilizó, en la primera reacción 3 μ l del ADN extraído de la sangre periférica de los gatos y en la segunda 3 μ l de una dilución 1:10 del producto amplificado de la primera. En ambos casos el volumen de la PCR fue de 25 μ l.

La reacción se desarrolló en tubos de pared fina para PCR de 0,2 ml, en el termociclador PTC-100™ (MJ Research, Waltham, MA, EE.UU.) siguiendo el programa doble que se señala en la Tabla 3.2.6.

Mezcla de PCR para FeLV y FIV

- Agua MilliQ libre de DNasa y RNasa
- Tampón de reacción 10x
- 40 μ M de dNTPs
- 0,4 mM oligonucleótidos iniciadores
- 1 U de ADN polimerasa/25 μ l
- 12% v/v de muestra (3 μ l)

Tabla 3.2.6. Programa de la PCR doble anidada para FeLV y FIV utilizada en el diagnóstico.

Primer amplificación		
Fase	Temperatura	Tiempo
1	94°C	7 min
2	94°C	1 min
	51°C	1 min
	72°C	3 min
	30 ciclos	
3	72°C	10 min

Segunda amplificación		
Fase	Temperatura	Tiempo
1	94°C	7 min
2	94°C	1 min
	51°C	1 min
	72°C	1,5 min
	25 ciclos	
3	72°C	10 min

Para comprobar que el producto amplificado tenía el tamaño correcto, se diluyó 15 μ l del producto amplificado de PCR con 5 μ l de tampón de carga. Esta mezcla se analizó en gel de agarosa (Conda, S.A., Torrejón de Ardoz, España) al 1,5% en TAE 1X, teñido con bromuro de etidio (0,5 μ g/ml) (Merck & Co., Inc., Rahway, NJ, EE.UU.), sometiéndolo a 90 V durante 20 minutos.

El producto amplificado se visualizó con luz ultravioleta, y posteriormente se captó la imagen con el sistema GelDoc™ y el software de análisis de geles Quantity-One® (Bio-Rad Laboratorios S.A., Madrid, España). El tamaño de la banda obtenida se calculó por comparación con un marcador de peso molecular (100 bp Ladder, Biotools).

Tampón de carga

- 0,25% azul bromofenol
- 40% sacarosa
- Agua destilada

3.2.15. Cuantificación de ADN en la muestra mediante PCR a tiempo real

Dado que la intensidad de la señal de qPCR puede depender de la cantidad de ADN proviral extraído, los resultados de la PCR a tiempo real se expresaron en proporción a la cantidad de ADN de la muestra, cuantificada a través del gen constitutivo para gliceraldehído-3 fosfato deshidrogenasa (GAPDH) (Basi y col., 2003). En este caso, no se utilizó una sonda, sino que uno de los oligonucleótidos poseía la denominada cola Z, una secuencia de 18 nucleótidos (ACTGAACCTGACCGTACA), patentada por Amersham Pharmacia Biotech, que no se encuentra en la naturaleza, y que se incorpora a la hebra de ADN cuando ésta se polimeriza. Posteriormente, el sistema Amplifluor™ Uniprimer™ se une a la cola Z y emite fluorescencia cuando se duplica el material genético (Figura 3.2.4.). La intensidad de la fluorescencia, proporcional al número de copias, es cuantificada por el termociclador.

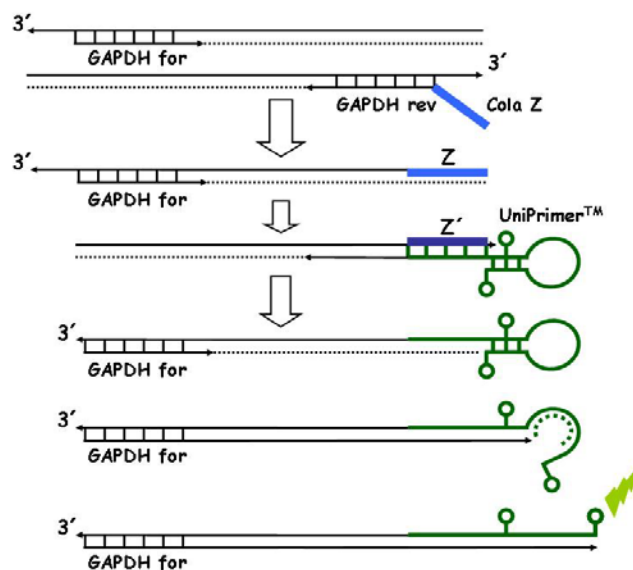


Figura 3.2.3. Esquema de la reacción de PCR cuantitativa empleando la denominada cola Z que se une al UniPrimer™ (adaptado de Amersham Pharmacia Biotech).

Las reacciones para cuantificar el gen de la GAPDH se llevaron a cabo en una solución de agua MilliQ libre de DNasa y RNasa (Sigma) con 6 mM de MgCl₂ (Biotools), 0,5 μM del oligonucleótido sin cola Z (Genosys-Sigma), 0,05 μM del oligonucleótido con cola Z (Genosys-Sigma), y 1U de ADN polimerasa Titanium® (Biotools). Los oligonucleótidos iniciadores específicos para GAPDH se muestran en la Tabla 3.2.7.

Mezcla de qPCR para GAPDH

- Agua MilliQ libre de DNasa y RNasa
- Tampón de reacción 10x
- 6 mM de MgCl₂
- 40 μM de dNTPs
- 0,05 μM oligonucleótido iniciador con cola Z
- 0,5 μM oligonucleótido iniciador sin cola Z
- 0,5 μM Amplifluor™ UniPrimer™
- 1 U de ADN polimerasa/ x μl de reacción
- 12% v/v de muestra de ADN

Tabla 3.2.7. Oligonucleótidos iniciadores para el gen constitutivo (GAPDH) y tamaño del fragmento amplificado (Basi y col., 2003) (se muestra en negrita la cola Z).

Oligonucleótido iniciador	Secuencia	Tamaño (pb)
GAPDH for	5'-CGGAGTCAACGGATTGGTCGTAT-3'	307
GAPDH rev	5'- ACTGAACCTGACCGTACA AGCCTCTCCATGGTGGTGAAGAC-3'	

Las reacciones se llevaron a cabo en el termociclador Mx3000P (Stratagene). Los programas de termociclado que se emplearon son los indicados en la Tabla 3.1.2. para la PCR cuantitativa de FIV y de FeLV. Los programas originales, descritos por Leutenegger y col., (1999) y Pinches y col., (2006), habían sido modificados ligeramente para permitir la amplificación conjunta de los genomas víricos y de GAPDH, introduciendo una fase de elongación, no necesaria cuando se emplean sondas fluorescentes, pero imprescindible en el sistema de UniPrimer para incorporar la cola Z a cada nueva hebra de ADN polimerizado. La fluorescencia emitida se midió con un filtro FAM. Para comprobar que la emisión de fluorescencia era debida a la formación de la banda de GAPDH, se determinó la temperatura de separación de las bandas (T_m), que depende de la longitud del producto y de su contenido en G+C; además, se realizó una electroforesis en gel de agarosa para visualizar la banda, siguiendo las indicaciones explicadas en el apartado 3.2.14. y comprobando que su peso coincidía con el esperado, entre 300 y 350 pb.

3.2.16. Cuantificación de provirus en sangre periférica por PCR a tiempo real

La cuantificación del provirus circulante se realizó mediante PCR a tiempo real (qPCR) a partir del ADN extraído de las muestras de sangre periférica (apartado 3.2.13.), siguiendo el método descrito en el apartado 3.1.10. Los resultados se expresaron en relación a la cantidad de ADN de la muestra, cuantificada a través del gen constitutivo de la GAPDH (apartado 3.2.15.), dividiendo el ciclo umbral del virus entre el ciclo umbral del GAPDH. Una variación del 20% de la relación inicial se consideró como disminución (si aumentaba la relación) o aumento de la carga (si disminuía), respectivamente.

3.2.17. Análisis estadístico de los estudios *in vivo*

Los datos fueron tratados en el Servicio Informático de Apoyo a la Investigación del Centro de Proceso de Datos de la Universidad Complutense mediante los programas Origin Pro 7.5., SPSS 14.0. y Statgraphics Plus 5.1.

Los datos se compararon mediante las pruebas del Chi Cuadrado y T de Student, con una significación del 0,95. Cuando el número de gatos en los grupos a analizar no era lo suficientemente numeroso y no permitía llegar a una conclusión estadísticamente significativa al 0,95, se estableció una significación <0,8 para comparar estos datos. Se estableció que las correlaciones eran estadísticamente significativas cuando $p < 0,05$; se consideró correlación alta cuando $R \geq 0,7$ y correlación media cuando $0,4 < R < 0,7$.

RESULTADOS

4.1. Estudios *in vitro*

4.1.1. Efecto del interferón sobre las células U937

Ninguno de los IFNs empleados tuvo efectos sobre la distribución de las poblaciones celulares (viables, necróticas y apoptóticas) de U937 utilizada como control, en todas las concentraciones y tiempos de incubación estudiados. Los valores de viabilidad se mantuvieron entre 80-96%, y de apoptosis entre 3-7% (Figura 4.1.1.).

No se detectó actividad RT o presencia de p27 en los sobrenadantes celulares, o de ADN o ARN retroviral en esta línea celular.

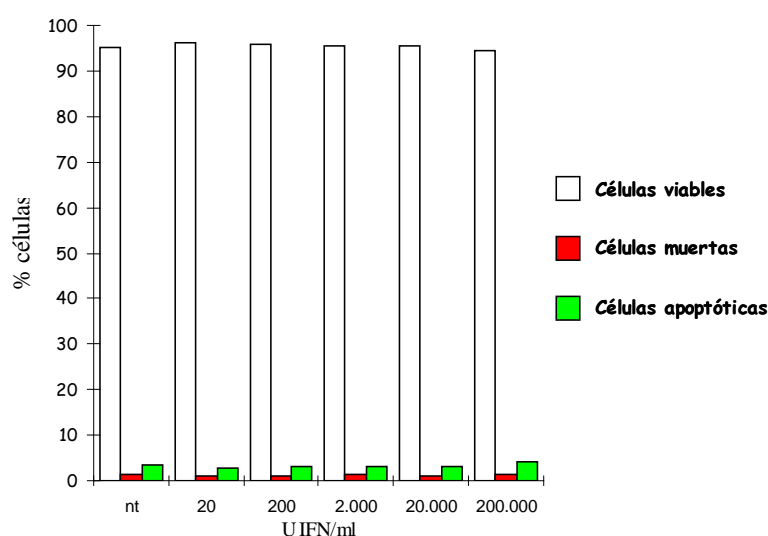


Figura 4.1.1. Viabilidad de los cultivos de U937 tratados con diferentes concentraciones de rIFN- ω durante 72h. Este efecto se vio de forma similar con los otros interferones y con los diferentes tiempos de incubación.

4.1.2. Efecto del interferón sobre las células crónicamente infectadas por FeLV (FL74)

Por el contrario, en la línea infectada FL74 se detectó un efecto dependiente de la dosis de IFN empleado sobre los valores RT y la viabilidad y apoptosis. Este efecto fue más evidente en tiempos de incubación más prolongados, siendo significativo ($p < 0,05$) después de 48-72 h de tratamiento con los tres subtipos de interferón estudiados.

4.1.2.1. Efecto en la expresión de la proteína p27

La concentración de la proteína p27 detectada en el sobrenadante de los cultivos con los tres subtipos de IFN fue constante durante todos los ensayos, independientemente del subtipo y concentración de interferón. Se observó un aumento de concentración de p27 en el sobrenadante celular al incrementar el tiempo de cultivo (Tabla 4.1.1., Figura 4.1.2.).

Tabla 4.1.1. Densidad óptica (D.O.) y concentración (ng/ml) de la proteína p27 en el sobrenadante de células FL74 a las 24, 48 y 72 h de tratamiento con interferón. nt, no tratadas.

Interferón	Unidades IFN/ml	p27					
		24h		48h		72h	
		D.O.	Concentr.	D.O.	Concentr.	D.O.	Concentr.
rHuIFN- α (A/D)	nt	0,119	13,0	0,165	15,3	0,330	28,4
	0,04	0,153	14,7	0,129	13,5	0,167	23,8
	0,4	0,094	11,9	0,171	15,7	0,210	26,9
	4	0,096	11,9	0,117	12,9	0,221	27,3
	40	0,134	13,7	0,186	16,5	0,175	18,9
	400	0,164	15,3	0,225	19,1	0,201	20,5
rHuIFN- α (2a)	nt	0,121	13,1	0,165	15,3	0,336	18,8
	30	0,111	12,6	0,179	16,1	0,286	19,0
	300	0,107	12,4	0,170	15,6	0,320	21,5
	3.000	0,090	11,7	0,127	13,4	0,325	17,4
	30.000	0,103	12,2	0,153	14,7	0,223	16,1
	300.000	0,116	12,8	0,141	14,1	0,246	14,6
rFeIFN- ω	nt	0,101	12,2	0,183	16,3	0,222	27,8
	20	0,111	12,6	0,182	16,3	0,224	15,5
	200	0,109	12,5	0,183	16,3	0,259	18,0
	2.000	0,090	11,7	0,159	15,0	0,200	18,8
	20.000	0,095	11,9	0,145	14,3	0,180	15,9
	200.000	0,126	13,3	0,210	18,0	0,151	17,4

4.1.2.2. Efecto en la actividad retrotranscriptasa (RT)

La actividad retrotranscriptasa (RT) de los sobrenadantes de los cultivos de U937 fue despreciable. Por el contrario, en los sobrenadantes de las células FL74 la actividad RT estaba marcadamente disminuida en las células tratadas con interferón, comparada con las células no tratadas (Figura 4.1.2.).

Se hallaron diferencias estadísticamente significativas con respecto a las células FL74 no tratadas, en concentraciones de interferón mayores o iguales a 20 U/ml de rFeIFN- ω ($p < 0,01$), 4 UI/ml de rHuIFN- α (A/D) ($p < 0,01$) y 30 UI/ml de rHuIFN- α (2a) ($p < 0,05$) con respecto a las células no tratadas controles con cada interferón (Tabla 4.1.2.). En el caso de rFeIFN- ω y rHuIFN- α (A/D), las diferencias pudieron observarse y fueron significativas desde las primeras 24h de tratamiento, mientras que con rHuIFN- α (2a) las diferencias significativas aparecieron sólo tras 48h de tratamiento (Figura 4.1.2., Tabla 4.1.2.).

El valor más bajo de Concentración Inhibitoria 50 (IC_{50}), concentración de IFN que reduce a la mitad la actividad RT, correspondió a rHuIFN- α (A/D), mientras que en rHuIFN- α (2a) fue 300 a 1000 veces mayor (Tabla 4.1.3.).

Tabla 4.1.2. Actividad del enzima RT en el sobrenadante de células FL74 a las 24, 48, y 72 h de tratamiento con interferón. nt, no tratado; * diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los valores con este signo y los que no los poseen.

Interferón	Unidades IFN/ml	Actividad RT		
		24h mU/ml	48h mU/ml	72h mU/ml
rHuIFN- α (A/D)	nt	0,730	0,690	0,818
	0,04	0,609	0,595	0,760
	0,4	0,614	0,544	0,692
	4	0,409*	0,258*	0,216*
	40	0,305*	0,085*	0,042*
	400	0,306*	0,126*	0,038*
rHuIFN- α (2a)	nt	0,635	0,626	0,666
	30	0,527	0,410*	0,473*
	300	0,537	0,367*	0,337*
	3.000	0,546	0,283*	0,177*
	30.000	0,543	0,102*	0,124*
	300.000	0,462	0,067*	0,037*
rFeIFN- ω	nt	0,622	0,824	0,705
	20	0,415*	0,188*	0,204*
	200	0,354*	0,116*	0,031*
	2.000	0,389*	0,124*	0,034*
	20.000	0,418*	0,066*	0,021*
	200.000	0,390*	0,069*	0,041*

Tabla 4.1.3. Concentración Inhibitoria 50 (IC_{50}) (U/ml) para la actividad RT de FeLV en el sobrenadante y para la viabilidad celular de FL74 a las 48 y 72 h de tratamiento con IFN.

Interferón	Actividad RT			Viabilidad		
	24h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h
rHuIFN- α (A/D)	n/d	3,12	0,73	n/d	146,72	14,09
rHuIFN- α (2a)	n/d	943,43	868,04	n/d	10^7	10^6
rFeIFN- ω	n/d	10,11	15,02	n/d	6093,85	124,77

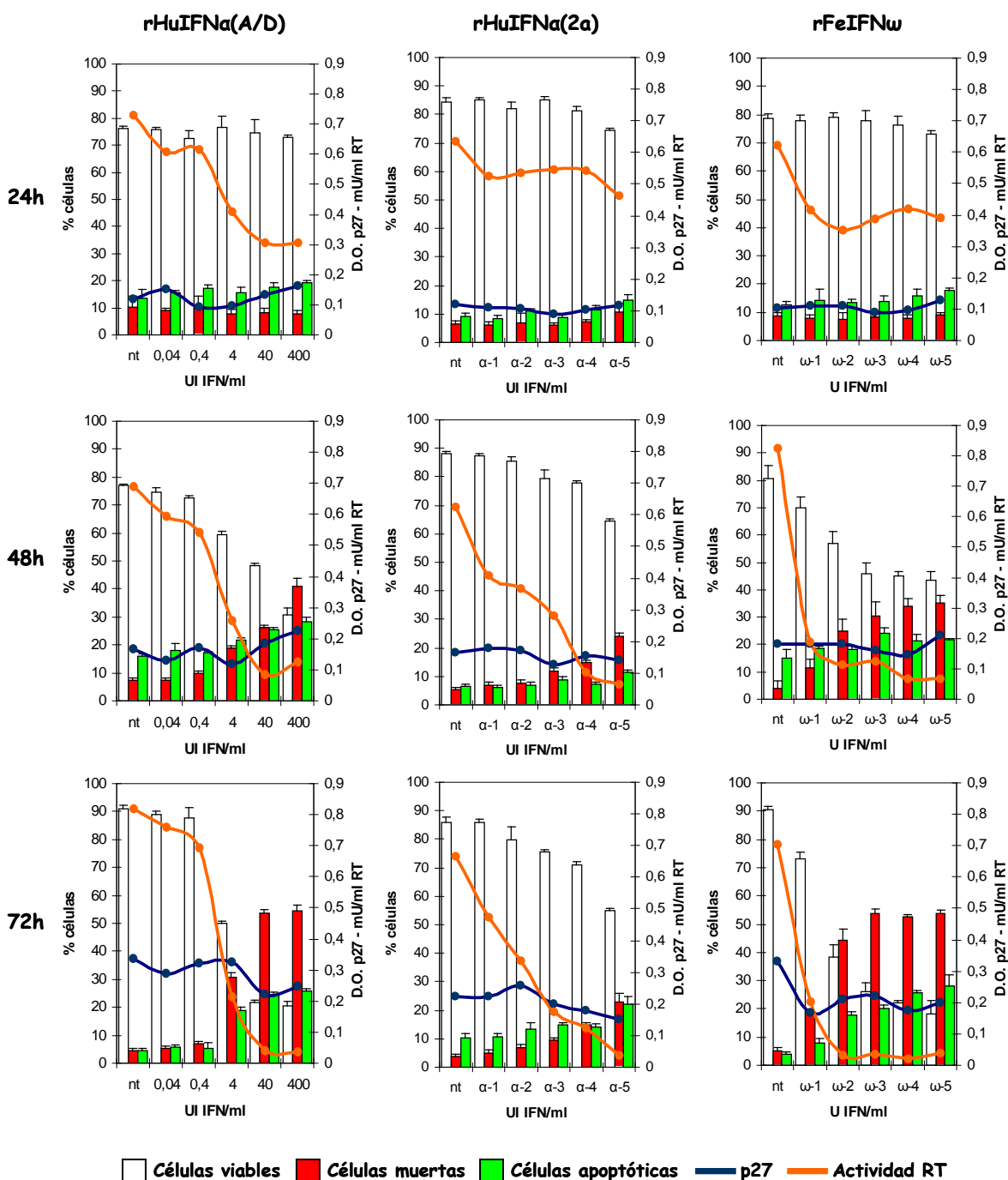


Figura 4.1.2. Variación de las poblaciones celulares (barras), la proteína p27 y la actividad RT (líneas) en células FL74 tratadas con diferentes concentraciones de interferón a lo largo del tiempo. nt, no tratado; D.O., densidad óptica.

Concentraciones: α-1, 30 UI/ml; α-2, 300 UI/ml; α-3, 3.000 UI/ml; α-4, 30.000 UI/ml; α-5, 300.000 UI/ml; ω-1, 20 U/ml; ω-2, 200 U/ml; ω-3, 2.000 U/ml; ω-4, 20.000 U/ml; ω-5, 200.000 U/ml.

4.1.2.3. Efecto sobre la viabilidad celular y la apoptosis

Las células FL74 tratadas con interferón mostraron diferencias significativas en viabilidad y apoptosis con respecto a las células no tratadas. La apoptosis y la mortalidad celular se incrementó en las células tratadas con ≥ 2.000 U/ml rFeIFN- ω /ml durante 48h, o ≥ 20 U/ml durante 72 h ($p < 0,05$), o con ≥ 4 UI/ml de rHuIFNa(A/D)/ml durante 48 ó 72h de tratamiento ($p < 0,05$) (Tabla 4.1.4.).

El tratamiento con rHuIFN- α (2a), independientemente de la concentración y el tiempo de tratamiento, no alcanzó a reducir un 50% la viabilidad celular. No obstante, se redujo la viabilidad significativamente con concentraciones de ≥ 3.000 UI/ml durante 48h, o 300 UI/ml durante 72 h ($p < 0,05$); sin embargo, la apoptosis no se vio afectada de forma significativa con estas concentraciones y tiempos estudiados (Tabla 4.1.4., Figura 4.1.3.). Según la IC₅₀ para la viabilidad, el subtipo de interferón más eficaz fue el rHuIFN- α (A/D) (Tabla 4.1.5.).

Tabla 4.1.4. Porcentaje de cada una de las poblaciones celulares de FL74 tratadas con los interferones rHuIFN- α (A/D), rHuIFN- α (2a) y rFeIFN- ω . nt, no tratado; * diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los valores con este signo y los que no los poseen.

Interferón	Unidades IFN/ml	Poblaciones celulares (%)								
		24h			48h			72h		
		viable	apopt.	necrot.	viable	apopt.	necrot.	viable	apopt.	necrot.
rHuIFN- α (A/D)	nt	76,1	13,6	10,3	76,9	15,9	7,2	91,1	4,4	4,5
	0,04	75,6	15,5	8,8	74,4	18,1	7,5	89,0	5,7	5,3
	0,4	72,7	17,3	10,0	72,7	17,4	9,9	87,7	5,4	6,8
	4	76,5	15,7	7,8	59,6*	21,7*	18,7*	50,1	18,9*	30,9*
	40	74,5	17,5	8,0	48,4*	25,5*	26,1*	21,8	24,5*	53,7*
	400	72,9	19,1	8,0	30,7*	28,3*	40,9*	20,4	25,9*	54,7*
rHuIFN- α (2a)	nt	84,2	9,3	6,4	88,2	6,4	5,4	86,0	10,2	3,8
	30	85,2	8,6	6,2	87,3	6,0	6,7	85,7	10,6	5,1
	300	82,3	10,9	7,0	85,5	6,7	7,8	79,9*	13,3	6,8*
	3000	85,3	8,7	6,0	79,5*	8,8	11,7*	75,5*	14,9	9,6*
	30000	81,4	11,5	7,0	77,9*	7,3	14,8*	70,9*	14,1	14,9*
	300000	74,3	14,9	10,7	64,6*	11,4	24,0*	55,1*	22,1	22,9*
rFeIFN- ω	nt	78,6	12,5	8,8	80,7	15,2	4,1	90,7	4,0	5,3
	20	77,9	14,4	7,7	69,9	18,6	11,6	73,1	7,8*	19,0*
	200	79,0	13,6	7,5	57,1	18,2	24,7	38,2	17,7*	44,1*
	2000	77,9	13,8	8,3	45,8*	24,0*	30,3*	26,0	20,1*	53,9*
	20000	76,1	15,8	8,0	44,9*	21,3*	33,8*	21,9	25,6*	52,4*
	200000	73,3	17,6	9,1	43,3*	21,6*	35,1*	18,3	28,0*	53,6*

La viabilidad celular se redujo un 60,0% con 400 U/ml de rHuIFN α (A/D) durante 48h, mientras que con este tiempo de tratamiento ninguna concentración de rHuIFN- α (2a) o de rFeIFN- ω estudiada llegó a reducir la viabilidad un 50% (26,8% con 300.000 UI/ml de rHuIFN- α (2a) y 46,3% con 200.000 de rFeIFN- ω).

En todos los casos, el porcentaje de aumento de necrosis celular fue superior al de apoptosis. Así, concentraciones ≥ 40 UI/ml de rHuIFN- α (A/D) durante 72h aumentaron el porcentaje de células necróticas más de 1000 veces, mientras que el de apoptosis fue de 460-490 veces (Tabla 4.1.5.). Los interferones rHuIFN- α (2a) y rFeIFN- ω tuvieron un menor efecto citotóxico, necesitando mayores concentraciones de interferón para aumentar el porcentaje de necrosis y apoptosis en la misma proporción que rHuIFN- α (A/D); por ejemplo, 200.000 U/ml de rFeIFN- ω durante 72h aumentaron la necrosis un 909,8% y la apoptosis 595,8% y 300.000 UI/ml de rHuIFN- α (2a) durante el mismo tiempo aumentan la necrosis un 503,7% y la apoptosis un 116,3% (Tabla 4.1.5.).

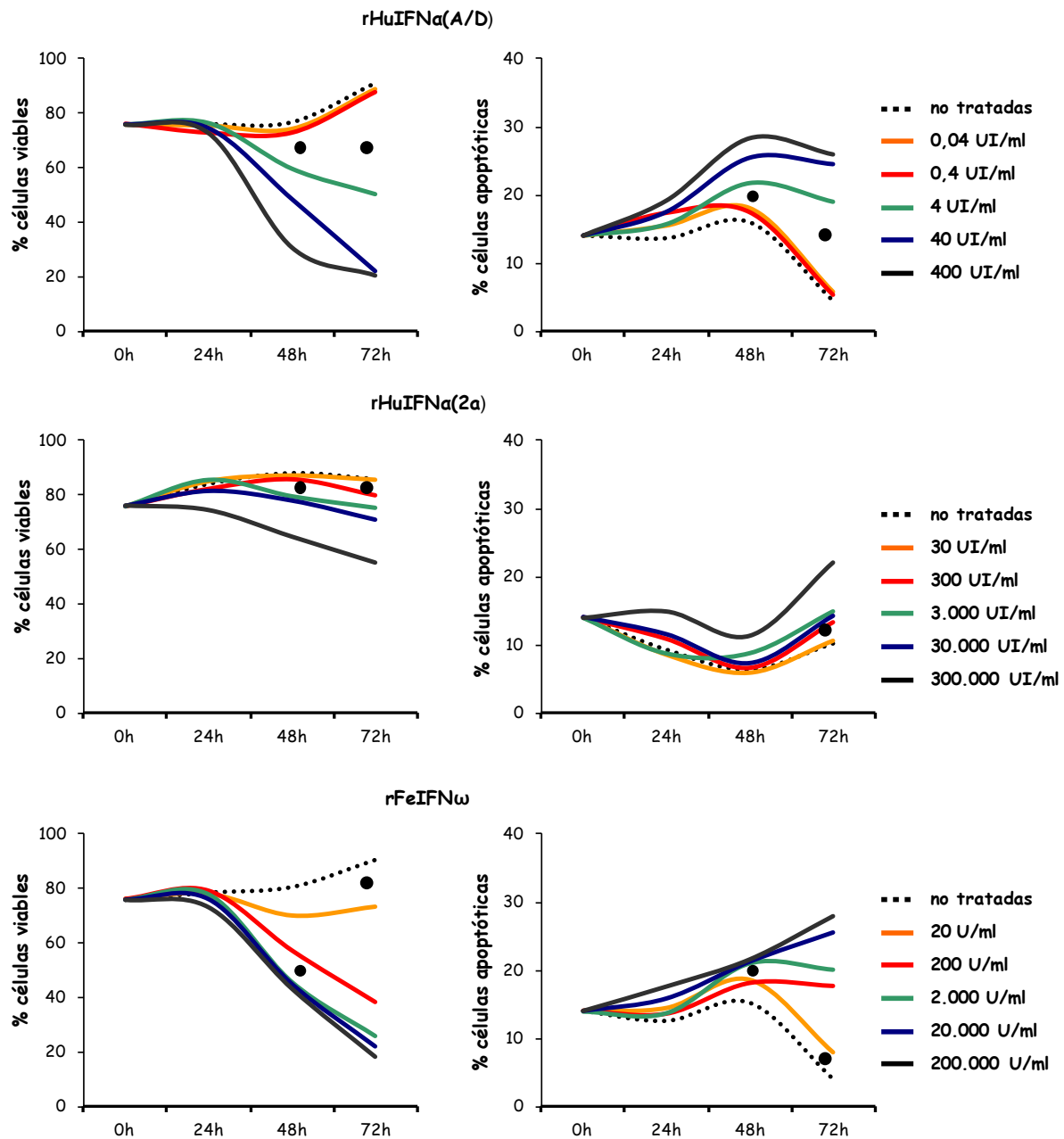


Figura 4.1.3. Variación en el tiempo del porcentaje de células vivas y apoptóticas de la línea celular FL74 tratada con rHuIFN-α(A/D), rHuIFN-α(2a) y rFeIFN-ω.●, concentración a las 48 y 72 h a partir de la cual existen diferencias significativas con respecto a las células no tratadas.

Tabla 4.1.5. Porcentaje de disminución de la viabilidad y aumento de la apoptosis y necrosis de las células FL74 tratadas durante 48 o 72 h con los interferones rHuIFN- α (A/D), rHuIFN- α (2a) y rFeIFN- ω , con respecto a estas mismas células no tratadas. *, disminución de la apoptosis.

Interferón	Unidades IFN/ml	Poblaciones celulares (%)					
		48h			72h		
		viables	apoptóticas	necróticas	viables	apoptóticas	necróticas
rHuIFN- α (A/D)	0,04	3,1	13,6	3,6	2,2	29,4	16,1
	0,4	5,4	9,1	37,6	3,7	23,5	50,5
	4	22,5	36,1	160,3	45,0	331,7	582,8
	40	37,0	59,7	262,4	76,0	458,3	1084,5
	400	60,0	77,7	468,6	77,6	490,9	1106,8
rHuIFN- α (2a)	30	1,1	-7,0*	25,9	0,3	3,8	35,4
	300	3,1	4,4	45,3	7,1	30,2	80,5
	3.000	9,8	36,9	117,7	12,2	46,6	152,2
	30.000	11,7	14,2	175,6	17,6	38,7	293,9
	300.000	26,8	77,6	348,5	36,0	116,3	503,7
rFeIFN- ω	20	13,5	22,2	183,8	19,4	95,0	258,4
	200	29,3	19,9	505,6	57,9	341,5	730,1
	2.000	43,3	57,9	642,6	71,3	399,2	914,9
	20.000	44,4	40,1	728,4	75,8	536,3	887,2
	200.000	46,3	42,1	759,6	79,8	595,8	909,8

4.1.2.4. Efecto sobre el número de copias de ARN vírico

Se cuantificó el número de copias víricas en el ADNc que se obtuvo a partir del ARN celular mediante la técnica de qPCR. Los resultados obtenidos no demostraron diferencias significativas entre el número de copias del virus en las células no tratadas y tratadas con cualquiera de los tres interferones, independientemente de la concentración y del tiempo de cultivo, siendo el ciclo umbral de crecimiento de 16,07-22,63 (Tabla 4.1.6.).

Tabla 4.1.6. Ciclo umbral de crecimiento de células FL74 a las 24, 48, y 72 h de tratamiento con interferón. nt, no tratado.

Interferón	Unidades IFN/ml	Ciclo umbral de crecimiento		
		24h	48h	72h
rHuIFN- α (A/D)	nt	19,43	17,92	16,63
	0,04	19,68	16,28	16,63
	0,4	20,65	17,65	16,80
	4	21,29	18,96	16,27
	40	21,56	17,93	17,09
	400	20,52	17,85	17,85

Tabla 4.1.6. (cont) Ciclo umbral de crecimiento de células FL74 a las 24, 48, y 72 h de tratamiento con interferón. nt, no tratado.

Interferón	Unidades IFN/ml	Ciclo umbral de crecimiento		
		24h	48h	72h
rHuIFN- α (2a)	nt	22,83	16,72	17,59
	30	17,91	16,98	19,86
	300	17,80	17,03	21,08
	3.000	19,43	16,91	21,93
	30.000	20,72	17,76	19,31
	300.000	19,83	17,15	19,83
rFeIFN- ω	nt	18,07	18,51	16,49
	20	17,00	18,92	17,21
	200	18,13	17,67	16,46
	2.000	21,12	21,27	17,98
	20.000	20,60	20,96	16,52
	200.000	21,58	19,52	16,97

4.1.3. Efecto del interferón sobre las células FeTJ

Las concentraciones de interferón utilizadas no tuvieron efecto sobre la viabilidad celular y la apoptosis en las células no infectadas durante las primeras 48h de tratamiento, manteniendo una media de valores de viabilidad del 75-85% y de apoptosis del 5-10% en cualquier concentración. Sin embargo, el análisis que se realizó a las 72h reveló un aumento de la población necrótica que se hacía mayor al incrementar la concentración de cualquiera de los dos subtipos de interferón (Figura 4.1.4., Tabla 4.1.7.).

Tabla 4.1.7. Porcentaje de la cada una de las poblaciones celulares FeTJ sin infectar y tratadas durante 24, 48 y 72 h con los interferones rHuIFN- α (2a) y rFeIFN- ω . nt, no tratado; * diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los valores con este signo y los que no los poseen; apopt, apoptóticas; necrót, necróticas.

Tipo IFN	Unidades IFN/ml	Poblaciones celulares de FeTJ sin infectar								
		24h			48h			72h		
		viables	apopt	necrót	viables	apopt	necrót	viables	apopt	necrót
rHuIFN- α (2a)	nt	70,7	13,4	15,9	78,9	12,2	8,9	81,0	9,6	9,5
	15	70,6	14,3	15,1	74,9	16,3	8,8	64,0*	12,2	23,9*
	150	70,6	16,7	12,7	72,7	18,1	9,2	53,4*	13,9	32,7*
	1.500	68,8	18,5	12,7	72,5	17,7	9,8	46,9*	14,5	38,6*
	15.000	73,5	16,9	9,6	70,6	19,5	9,9	42,7*	16,7	40,6*
	150.000	71,4	16,7	11,9	69,0	21,1	9,9	35,4*	14,7	49,9*
rFeIFN- ω	nt	69,4	11,8	18,8	81,7	10,9	7,4	81,1	9,4	9,5
	15	65,9	16,3	17,7	82,1	10,7	7,2	67,8*	9,9	22,3*
	150	71,5	15,8	12,7	78,6	14,6	6,8	50,9*	12,6	36,6*
	1.500	68,4	15,5	16,1	76,2	14,2	9,7	47,5*	14,2	38,3*
	15.000	75,6	14,4	10,0	76,5	13,7	9,8	46,2*	13,3	40,4*
	150.000	76,3	12,0	11,7	75,8	14,1	10,2	44,1*	13,3	42,6*

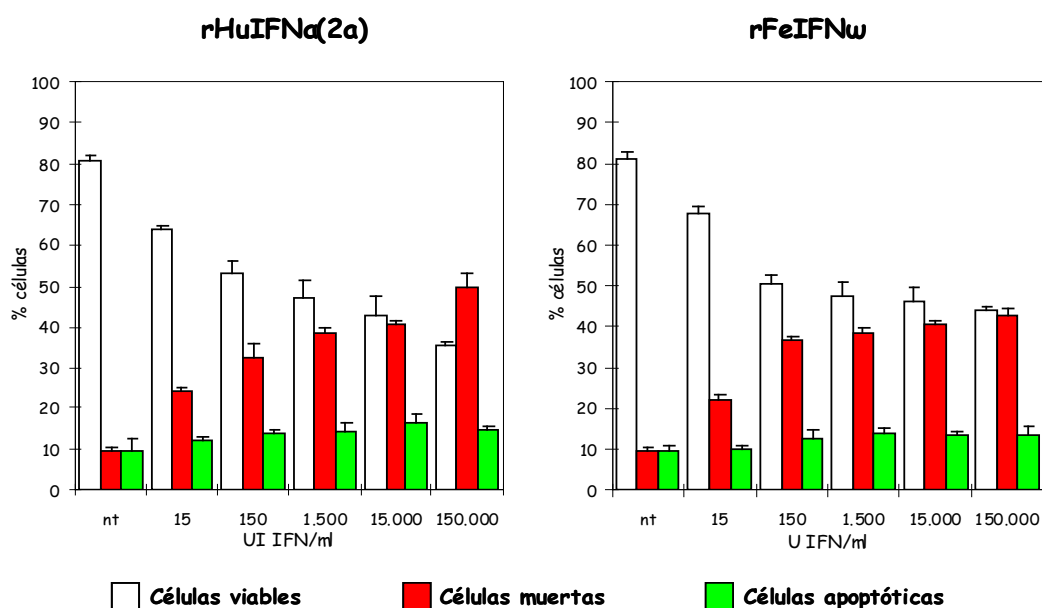


Figura 4.1.4. Variación de las poblaciones celulares en células FeTJ tratadas durante 72h con diferentes concentraciones de interferón.

4.1.4. Efecto del interferón sobre las células FeTJ infectadas por FIV_{GL8} (FeTJ-FIV_{GL8})

4.1.4.1. Efecto en la expresión de la proteína p24

Al igual que en el experimento *in vitro* con FL74, la concentración de la proteína de la cápside p24 en el sobrenadante de los cultivos de FeTJ-FIV_{GL8} permaneció invariable independientemente del subtipo y concentración del interferón utilizado. Se observó un aumento de concentración de p24 en el sobrenadante celular al aumentar el tiempo de cultivo (Tabla 4.1.8., Figura 4.1.5.)

Tabla 4.1.8. Concentración (expresado como D.O.) de proteína p24 en el sobrenadante de células FeTJ infectadas con FIV_{GL8} y tratadas durante 24, 48 o 72 h con interferón. nt, no tratadas.

Interferón	Unidades/ml	p24 (D.O.)		
		24 h	48 h	72 h
rHuIFN-α(2a)	nt	0,126	0,227	0,329
	15	0,138	0,226	0,308
	150	0,135	0,227	0,340
	1.500	0,122	0,217	0,354
	15.000	0,118	0,230	0,317
	150.000	0,157	0,260	0,349
rFeIFN-ω	nt	0,148	0,205	0,327
	15	0,155	0,211	0,355
	150	0,117	0,213	0,397
	1.500	0,119	0,249	0,403
	15.000	0,166	0,231	0,377
	150.000	0,203	0,280	0,384

4.1.4.2. Efecto sobre la actividad retrotranscriptasa (RT)

Se midió en el sobrenadante celular de FeTJ-FIV_{GL8} la actividad retrotranscriptasa, proporcional al número de partículas víricas infectivas. Los resultados obtenidos siguieron un esquema similar al de las células FL74 (apartado 4.1.1.2.), en el sentido de que hubo una marcada disminución de la actividad RT a mayores concentraciones y tiempo de tratamiento con ambos interferones. Sin embargo, las diferencias estadísticamente significativas aparecieron más tardíamente y con concentraciones superiores que en FL74. Las diferencias fueron significativas tras 72h de tratamiento con concentraciones mayores o iguales a 150 U/ml de rFeIFN- ω y 1500 HuIFN α (2a) ($p < 0,05$). Además a diferencia de FL74, los resultados de actividad RT en las células FeTJ-FIV_{GL8} fueron negativos durante las primeras 24 h de tratamiento (Figura 4.1.5., Tabla 4.1.9.).

Tabla 4.1.9. Actividad RT en el sobrenadante de células FeTJ infectadas con FIV_{GL8} y tratadas con interferón. nt, no tratado; * diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los valores con este signo y los que no los poseen.

Interferón	Unidades IFN/ml	Actividad RT		
		24 h mU/ml	48 h mU/ml	72 h mU/ml
rHuIFN- α (2a)	nt	-	0,473	0,646
	15	-	0,420	0,599
	150	-	0,425	0,577
	1.500	-	0,446	0,384*
	15.000	-	0,463	0,212*
	150.000	-	0,450	0,187*
rFeIFN- ω	nt	-	0,552	0,744
	15	-	0,485	0,626
	150	-	0,366	0,356*
	1.500	-	0,389	0,124*
	15.000	-	0,362	0,066*
	150.000	-	0,368	0,069*

En comparación con las células no tratadas, la concentración del enzima RT se redujo en un 71,1% en las células tratadas con 150.000 UI/ml de rHuIFN- α (2a) durante 72 h y en un 90,7% en las tratadas con la misma concentración de rFeIFN- ω y tiempo. Al calcular la concentración a la que se produce una reducción a la mitad de la concentración de la enzima RT (IC_{50}) se observó que la concentración necesaria de rHuIFN- α (2a) para obtener el mismo resultado que con rFeIFN- ω fue 25 veces mayor (Tabla 4.1.10.).

Tabla 4.1.10. Concentración Inhibitoria 50 (IC_{50}) de actividad RT de FIV en el sobrenadante de células FeTJ-FIV_{GL8} a las 72 h de tratamiento con IFN.

Interferón	Unidades IFN/ml
rHuIFN- α (2a)	3.554
rFeIFN- ω	147

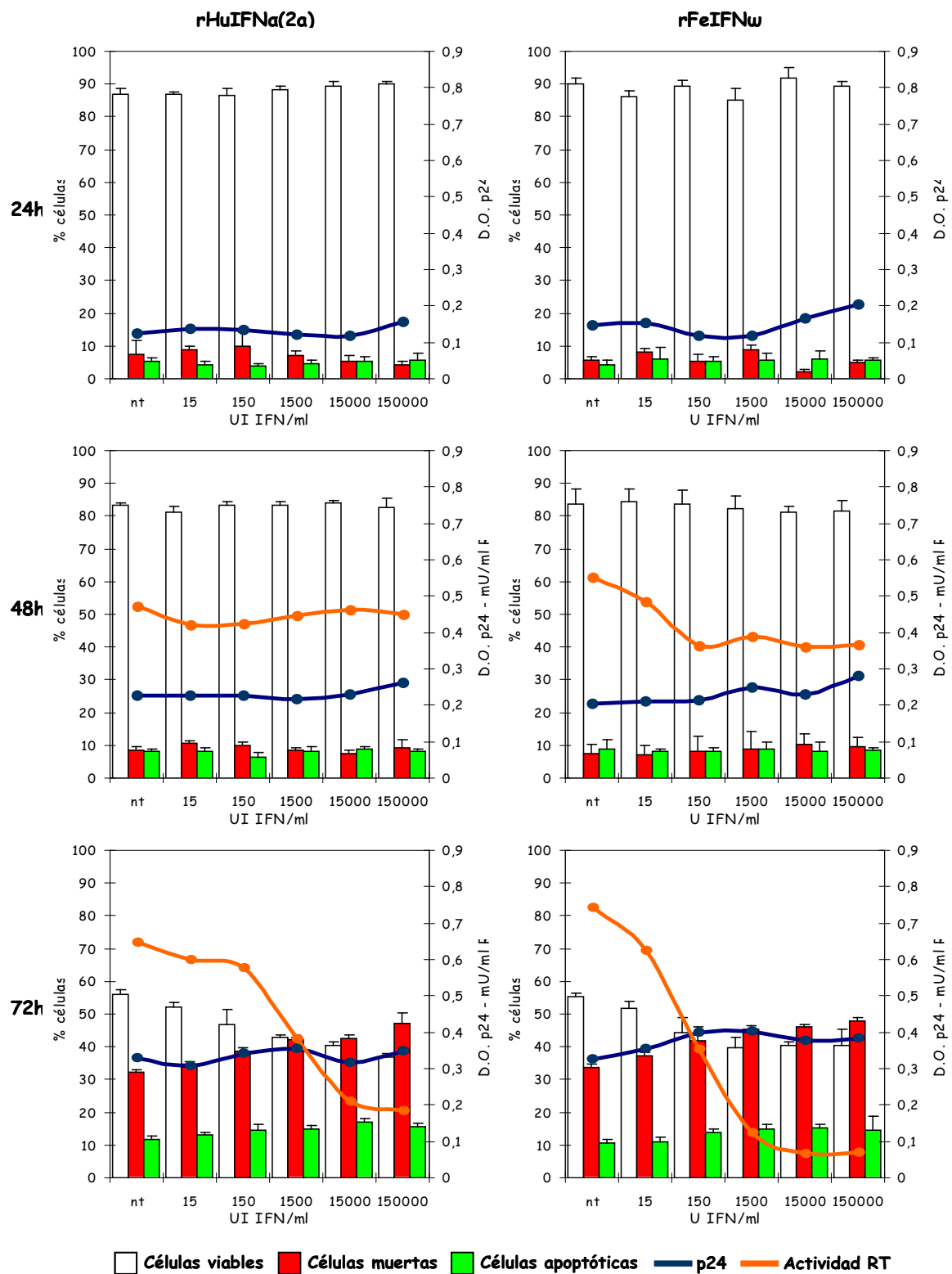


Figura 4.1.5. Variación de las poblaciones celulares (barras), la proteína p24 y la actividad RT (curvas) en FeTJ-FIV_{GL8} tratadas con diferentes concentraciones de interferón a lo largo del tiempo. nt, no tratado; D.O., densidad óptica.

4.1.4.3. Efecto sobre la viabilidad celular y la apoptosis

Se observó mediante citometría de flujo variaciones en la viabilidad de las células FeTJ-FIV_{GL8} tratadas y no tratadas con interferón. Tras 72 h de cultivo la viabilidad de las células FeTJ-FIV_{GL8} no tratadas se redujo un 25% con respecto a las FeTJ no tratadas, por lo que se podría asumir que esta mayor mortalidad es debida al efecto del virus sobre dichas células (Tabla 4.1.11).

Tabla 4.1.11. Porcentaje de viabilidad de las células FeTJ y FeTJ-FIV_{GL8} no tratadas a las 72h de incubación y diferencia de porcentaje entre ellas.

Tipo IFN	FeTJ	FeTJ-FIV _{GL8}	Diferencia entre las poblaciones
	Viabilidad (%)		
rHuIFN-α(2a)	80,95	55,93	25,02
rFeIFN-ω	81,1	55,41	25,69
	Apoptosis (%)		
rHuIFN-α(2a)	9,6	11,8	2,2
rFeIFN-ω	9,4	10,8	1,4
	Necrosis (%)		
rHuIFN-α(2a)	9,5	32,2	22,7
rFeIFN-ω	9,5	33,8	24,3

Tabla 4.1.12. Porcentaje de la cada una de las poblaciones celulares FeTJ infectadas con FIV_{GL8} y tratadas con los interferones rHuIFN- α (2a) y rFeIFN- ω . nt, no tratado; * diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los valores con este signo y los que no los poseen.

Tipo IFN	Unidades IFN/ml	Poblaciones celulares (%)								
		24h			48h			72h		
		viable	apopt.	necrot.	viable	apopt.	necrot.	viable	apopt.	necrot.
rHuIFN- α (2a)	nt	86,92	5,5	7,6	83,2	8,2	8,7	55,9	11,8	32,2
	15	86,86	4,4	8,7	81,1	8,3	10,6	52,3	13,1	34,6
	150	86,36	3,9	9,8	83,4	6,5	10,1	46,7	14,4	38,8
	1.500	88,45	4,6	6,9	83,3	8,3	8,4	42,8*	14,9	42,3*
	15.000	89,33	5,3	5,4	83,9	8,7	7,4	40,3*	17,0	42,7*
	150.000	89,90	5,7	4,4	82,7	8,2	9,1	37,0*	15,7	47,2*
rFeIFN- ω	nt	90,17	4,3	5,5	83,6	8,8	7,5	55,4	10,8	33,8
	15	86,09	5,9	8,0	84,6	8,2	7,2	51,6	11,0	37,3
	150	89,37	5,4	5,2	83,8	8,0	8,1	44,3*	13,7	42,0*
	1.500	85,19	5,8	9,0	82,1	9,0	8,9	39,7*	15,0	45,2*
	15.000	91,84	6,1	2,0	81,4	8,3	10,3	40,6*	15,4	46,1*
	150.000	89,54	5,6	4,9	81,7	8,6	9,7	40,5*	14,7	47,7*

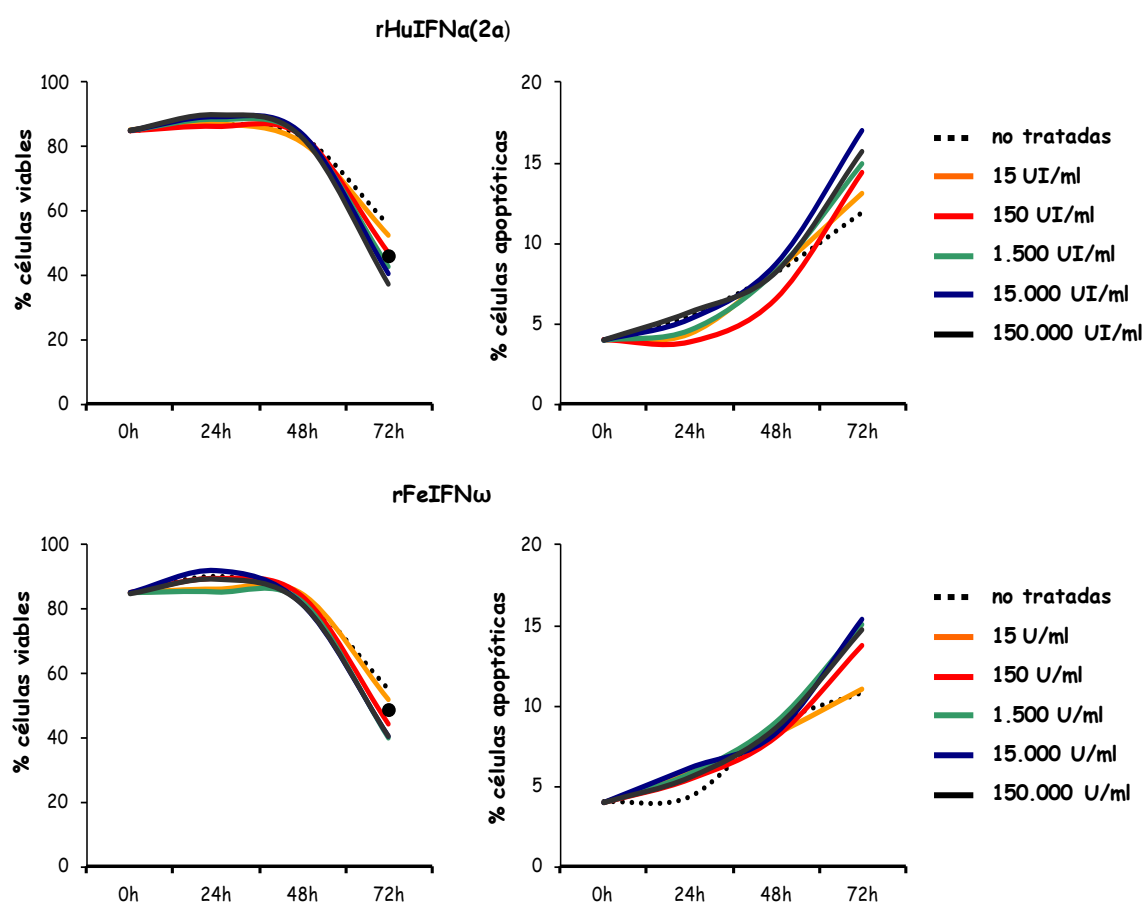


Figura 4.1.6. Variación en el tiempo del porcentaje de células vivas y apoptóticas de la línea celular FeTJ infectadas con FIV_{GL8} y tratadas con rHuIFN-α(2a) y rFeIFN-ω. ●, concentración a las 48 y 72 h a partir de la cual existen diferencias significativas con respecto a las células no tratadas.

Tabla 4.1.13. Porcentaje de reducción de la viabilidad de las células FeTJ infectadas y no infectadas con FIV_{GL8} tratadas con interferón durante 72 horas.

Interferón	Unidades IFN/ml	FeTJ	FeTJ + FIV _{GL8}
rHuIFN-α(2a)	15	9,8	6,5
	150	24,7	16,4
	1.500	33,9	23,4
	15.000	39,9	28,0
	150.000	50,1	33,8
rFeIFN-ω	15	3,2	6,8
	150	27,4	20,1
	1.500	32,2	28,3
	15.000	34,0	26,8
	150.000	37,1	26,8

Del mismo modo que en FeTJ, en las células FeTJ-FIV_{GL8} se produjo un mayor porcentaje de mortalidad en las células tratadas con interferón que en las no tratadas; además, ésta aumentó de forma correlativa a la concentración de interferón. Este aumento de la las células necróticas estuvo acompañado por una disminución en la población de células viables. Las diferencias fueron significativas tras 72h de tratamiento y con concentraciones de ≥ 150 U/ml de rFeIFN- ω o ≥ 1.500 U/ml de rHuIFN- $\alpha(2a)$ ($p < 0,05$) (Tabla 4.1.12).

Sin embargo, el porcentaje de reducción de viabilidad fue mayor en las FeTJ que en FeTJ-FIV_{GL8}. Esto se reprodujo en todas las concentraciones de interferón salvo con la mínima concentración empleada (15 U/ml) de rFeIFN- ω , donde la reducción de viabilidad fue mayor en las células infectadas que no infectadas (Tabla 4.1.13). De media el porcentaje de reducción de viabilidad de las células infectadas con FIV_{GL8} fue un 28% menor que el de las células no infectadas, siendo esta diferencia mayor en las tratadas con rHuIFN- $\alpha(2a)$ (32,0%) que con rFeIFN- ω (22%).

4.1.4.4. Efecto sobre el número de copias de ARN vírico

Se cuantificó la cantidad de ARN de FIV_{GL8} (apartado 3.1.10.) y, al igual que en las células FL74, no se observó que el interferón aumentara o disminuyera el número de copias de ARN, ya que los resultados de la RT-PCR a tiempo real mostraron curvas y puntos de crecimiento similares en todas las muestras independientemente del tipo de interferón, la concentración del mismo, y el tiempo de tratamiento, siendo el ciclo umbral de crecimiento de 28,12-33,25 (Tabla 4.1.14.).

Tabla 4.1.14. Ciclo umbral de crecimiento de FIV_{GL8} de células FeTJ infectadas con FIV_{GL8} y tratadas durante 24, 48 o 72 h con interferón. nt, no tratadas.

Interferón	Unidades/ml	Ciclo umbral de crecimiento		
		24 h	48 h	72 h
rHuIFN- $\alpha(2a)$	nt	30,62	30,31	33,20
	15	30,08	28,85	32,78
	150	32,28	29,01	30,39
	1.500	31,17	28,97	31,07
	15.000	30,72	29,34	30,25
	150.000	30,30	29,46	31,72
rFeIFN- ω	nt	31,47	32,03	31,45
	15	32,12	31,74	30,98
	150	32,24	31,05	32,01
	1.500	30,72	30,76	31,54
	15.000	29,10	29,26	30,65
	150.000	28,97	31,17	31,25

4.2. Población de estudio y situación inicial de los gatos del estudio *in vivo* para valorar la eficacia del rFeIFN α (2a) (Roferon®) en el tratamiento de las infecciones por FIV y por FeLV

4.2.1. Reseña de los gatos

Se incluyeron un total de 58 gatos en el estudio, 31 (53,45%) fueron FIV⁺ y 27 (46,55%) FeLV⁺. De todos ellos se conocía la edad, el sexo, estado reproductivo, la raza, el hábitat y su procedencia (Tablas 4.2.1., 4.2.2.). Todos ellos cumplieron los requisitos enumerados en el apartado 3.2.1.

Tabla 4.2.1. Reseña de los gatos FeLV⁺ incluidos en el estudio de Roferon®.

Código	Edad (años)	Sexo	Esterilización	Raza	Acceso al exterior	Procedencia
FeLV-01	2	♂	sí	Común Europeo	sí	vagabundo
FeLV-02	2	♂	sí	Común Europeo	sí	vagabundo
FeLV-03	1	♀	sí	Común Europeo	sí	vagabundo
FeLV-04	3	♂	sí	Común Europeo	sí	vagabundo
FeLV-05	2	♀	sí	Común Europeo	no	vagabundo
FeLV-06	1	♀	sí	Común Europeo	no	vagabundo
FeLV-07	0,7	♀	no	Común Europeo	no	vagabundo
FeLV-08	0,3	♂	no	Común Europeo	sí	propietario
FeLV-09	4,7	♂	no	Común Europeo	sí	vagabundo
FeLV-10	0,3	♀	no	Común Europeo	no	vagabundo
FeLV-11	1	♀	no	Común Europeo	sí	vagabundo
FeLV-12	0,5	♀	no	Común Europeo	no	vagabundo
FeLV-13	2	♀	sí	Común Europeo	sí	vagabundo
FeLV-14	1	♀	sí	Común Europeo	no	propietario
FeLV-15	3,5	♂	sí	Común Europeo	sí	vagabundo
FeLV-16	1	♂	sí	Común Europeo	no	vagabundo
FeLV-17	1	♀	no	Común Europeo	no	vagabundo
FeLV-18	6	♀	sí	Común Europeo	sí	vagabundo
FeLV-19	5	♂	sí	Común Europeo	no	vagabundo
FeLV-20	0,6	♂	sí	Común Europeo	sí	vagabundo
FeLV-21	0,5	♀	no	Común Europeo	no	vagabundo
FeLV-22	1	♀	sí	Persa	sí	propietario
FeLV-23	0,6	♂	sí	Común Europeo	sí	vagabundo
FeLV-24	3	♀	sí	Común Europeo	no	vagabundo
FeLV-25	0,6	♂	no	Común Europeo	no	propietario
FeLV-26	5	♀	sí	Común Europeo	sí	vagabundo
FeLV-27	2	♀	sí	Persa	no	propietario

Procedencia: “vagabundo”, gato recogido de la calle, de joven o de adulto; “propietario”, gato que vivía en otra casa antes de ser adoptado o que su madre tenía propietario.

Tabla 4.2.2. Reseña de los gatos FIV⁺ incluidos en el estudio de Roferon®.

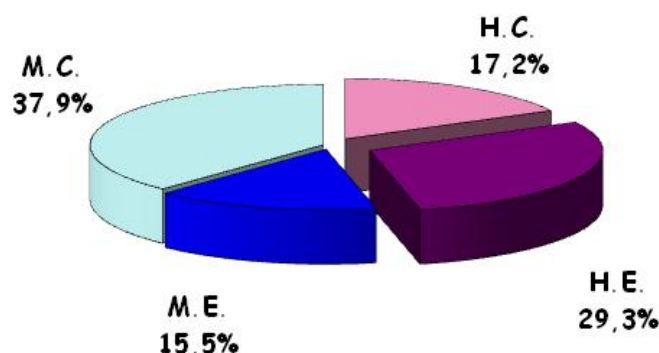
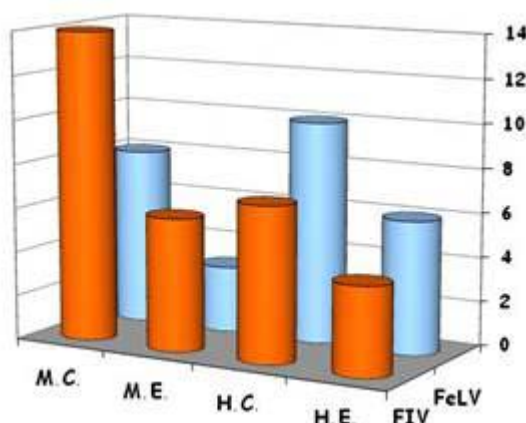
Código	Edad (años)	Sexo	Esterilización	Raza	Acceso al exterior	Procedencia
FIV-01	2	♀	sí	Común Europeo	sí	vagabundo
FIV-02	0,2	♂	no	Común Europeo	no	vagabundo
FIV-03	4,5	♂	sí	Común Europeo	sí	vagabundo
FIV-04	7	♂	sí	Común Europeo	no	vagabundo
FIV-05	1	♂	no	Común Europeo	no	vagabundo
FIV-06	2	♂	sí	Bombay	no	vagabundo
FIV-07	1,5	♂	sí	Común Europeo	sí	vagabundo
FIV-08	3	♂	sí	Común Europeo	sí	vagabundo
FIV-09	3	♀	sí	Común Europeo	no	vagabundo
FIV-10	0,5	♂	no	Común Europeo	no	vagabundo
FIV-11	4	♂	sí	Común Europeo	sí	propietario
FIV-12	3	♀	no	Persa	no	vagabundo
FIV-13	12	♂	sí	Común Europeo	sí	vagabundo
FIV-14	11	♀	no	Común Europeo	no	vagabundo
FIV-15	5	♀	sí	Común Europeo	sí	vagabundo
FIV-16	2	♀	sí	Común Europeo	sí	vagabundo
FIV-17	3	♂	no	Común Europeo	sí	vagabundo
FIV-18	3	♀	no	Persa	no	vagabundo
FIV-19	3	♂	sí	Común Europeo	no	vagabundo
FIV-20	14	♀	sí	Común Europeo	no	propietario
FIV-21	14	♀	sí	Común Europeo	sí	vagabundo
FIV-22	10	♂	no	Siamés	sí	vagabundo
FIV-23	5	♂	sí	Común Europeo	sí	vagabundo
FIV-24	7	♂	no	Común Europeo	no	vagabundo
FIV-25	3	♀	sí	Siamés	no	vagabundo
FIV-26	2,5	♀	no	Común Europeo	sí	vagabundo
FIV-27	0,8	♂	sí	Común Europeo	no	vagabundo
FIV-28	9	♂	sí	Común Europeo	no	vagabundo
FIV-29	3	♂	sí	Común Europeo	no	vagabundo
FIV-30	4	♂	sí	Común Europeo	sí	vagabundo
FIV-31	7	♂	sí	Común Europeo	no	vagabundo

Procedencia: "vagabundo", gato recogido de la calle, de cachorro o de adulto; "propietario", gato que vivía en otra casa antes de ser adoptado o que su madre tenía propietario.

De los 31 (51,7%) machos, el 71,0% estaba esterilizado, mientras que de las 28 (48,3%) hembras lo estaba el 60,7% (Tabla 4.2.3. y Figura 4.2.1.). Por lo tanto, un 66,1% del total de la población felina estudiada estaba esterilizada. En los gatos FeLV⁺, el grupo más numeroso fue el de hembras castradas (37,1%), mientras que en FIV⁺ fueron los machos castrados los más numerosos (45,2%) (Tabla 4.2.3. y Figura 4.2.2.). Se observó cierta diferencia en la distribución por sexos entre los gatos FeLV⁺ y FIV⁺ ($p < 0,15$), apareciendo un mayor número de hembras que machos FeLV⁺ y un número mayor de machos que hembras FIV⁺ (Tabla 4.2.3.).

Tabla 4.2.3. Número y porcentaje (mostrado entre paréntesis) de gatos FeLV⁺ y FIV⁺ de cada sexo incluidos en el estudio de Roferon®.

Sexo	Esterilización	FeLV ⁺ (27)		FIV ⁺ (31)		Total (58)	
♀ n (%)	no	16 (59,3)	6 (22,2)	11 (35,5)	4 (12,9)	28 (48,3)	10 (17,2)
	sí		10 (37,1)		7 (22,6)		17 (29,3)
♂ n (%)	no	11 (40,7)	3 (11,1)	20 (64,5)	6 (19,4)	31 (51,7)	9 (15,5)
	sí		8 (29,6)		14 (45,2)		22 (37,9)

**Figura 4.2.1.** Distribución por sexo de los gatos incluidos en el estudio de Roferon®. M.C., macho castrado; M.E., macho entero; H.C., hembra castrada; H.E., hembra entera.**Figura 4.2.2.** Distribución por infección y por sexo de los gatos incluidos en el estudio de Roferon®. M.C., macho castrado; M.E., macho entero; H.C., hembra castrada; H.E., hembra entera.

Al distribuir los gatos por edades se observó que el grupo más numeroso correspondió al de los tres años de edad; así, el 69,0% de los gatos estudiados tenían una edad inferior a cuatro años, siendo la media de tres años y medio. Sin embargo, se apreció una diferencia entre los grupos más numerosos de edad en ambas infecciones: en el caso de los gatos FeLV⁺ el grupo más numeroso correspondió a gatos de menos de un año de edad siendo la media global de 1,9 años, mientras en FIV⁺ el grupo de gatos con tres años fue el más numeroso (8 individuos - 25,8%) y la media de edad fue de 4,8 años, 2,5 veces mayor que la de los gatos FeLV⁺ (Tabla 4.2.4.). También la distribución por edades fue diferente para ambas infecciones: el 100% de los gatos infectados por FeLV eran menores de siete años; sin embargo, casi un tercio (29,0%) de los gatos FIV⁺ tenían entre siete y 14 años de edad, lo que supuso un 15,5% de la población total del estudio (Figura 4.2.3.) ($p < 0,05$). Los gatos jóvenes (<1 año) fueron un 29,6% (8 individuos) de los gatos FeLV⁺ y un 9,7% (3 individuos) de los gatos FIV⁺ ($p < 0,15$) (Tabla 4.2.4.).

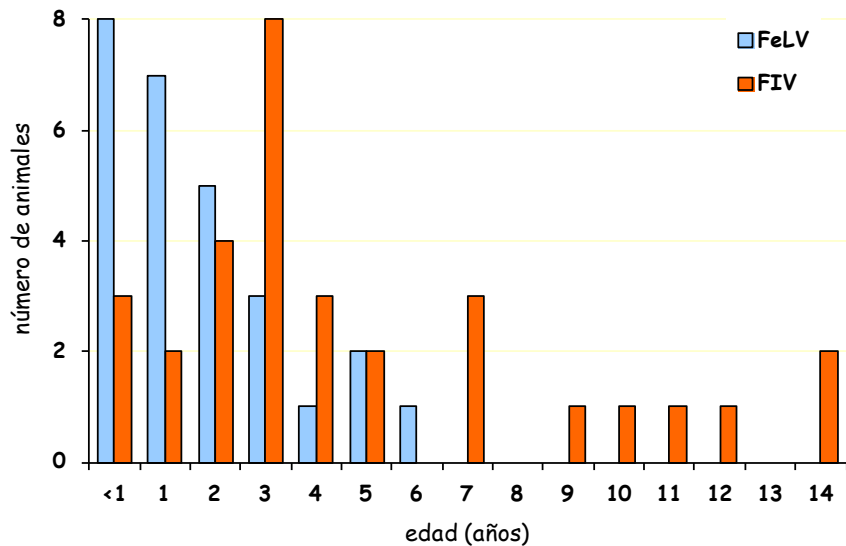


Figura 4.2.3. Distribución por edad de los gatos incluidos en el estudio de Roferon®.

Tabla 4.2.4. Características principales en cuanto a la edad observadas en la población de gatos FeLV⁺ y FIV⁺ en la V0 en el estudio de Roferon®.

Característica	FeLV ⁺	FIV ⁺
Media	1,9	4,8
Edad más frecuente (%)	< 1 año (29,6%)	3 años (25,8%)
Gatos jóvenes (< 1 año)	8 (29,6%)	3 (9,7%)
Gatos ≥ 7 años	0 (0,0%)	9 (29,0%)

Otros factores estudiados fueron la procedencia, el hábitat y la raza. De los 58 gatos incluidos en el estudio, 52 eran Comunes Europeos, cuatro Persas, dos Siameses y uno Bombay. Los gatos caseros y con acceso al exterior se distribuyeron prácticamente al 50%, 30 y 28 individuos, respectivamente; sin embargo, más del 85% de los gatos eran de origen vagabundo, es decir, los dueños los habían encontrado en la calle.

4.2.2. Situación clínica inicial de la población felina

Los signos clínicos de los gatos antes de iniciar el tratamiento eran bastante variados, como es característico en las infecciones retrovirales (Tablas 4.2.5. y 4.2.6.). Los gatos FeLV⁺ presentaron hasta ocho signos clínicos distintos y los FIV⁺ hasta siete, de los 14 contemplados. La puntuación clínica (P.C.) obtenida en el grupo de gatos FeLV⁺ varió entre cero y 13, y en el de FIV⁺ entre cero y nueve (Tabla 4.2.5., 4.2.6. y 4.2.8.).

Tabla 4.2.5. Signos clínicos observados y puntuación clínica (P.C.) en los gatos FeLV⁺ en la V0 en el estudio de Roferon®. Det: determinación; Alter: alteraciones.

Código	Disorexia/Anorexia	Astenia	Deshidratación	Det. condición corporal	Linfoadenomegalia	Alter. de las mucosas	Polidipsia/Poliuria	Conjuntivitis	Queratitis	Lesiones orales	Alter. digestivas	Lesiones cutáneas	Alter. respiratorias	Alter. neurológicas	Total signos clínicos	P.C.
FeLV-01	1	2						2		2		1			5	8
FeLV-02		1								2			1		3	4
FeLV-03															0	0
FeLV-04	1					1				2					3	4
FeLV-05	1	1								2					3	4
FeLV-06	1	1			2	1					1			2	6	8
FeLV-07															0	0
FeLV-08				1	2	1									3	4
FeLV-09															0	0
FeLV-10	2	1						2			1		1		5	7
FeLV-11	1	1			2			2					1		5	7
FeLV-12	2	2	1	1		1		2		2			2		8	13
FeLV-13															0	0
FeLV-14		1			2	1						1			4	5
FeLV-15				1									1		2	2
FeLV-16															0	0
FeLV-17															0	0
FeLV-18															0	0
FeLV-19						1									1	1
FeLV-20				1				2		2			1		4	6
FeLV-21															0	0
FeLV-22															0	0
FeLV-23	1							2		2		2			4	7
FeLV-24	1	1						2					1		4	5
FeLV-25				1	2	1				2	1		1		6	8
FeLV-26															0	0
FeLV-27															0	0
n %	9 33,3	9 33,3	1 3,7	5 18,5	5 18,5	7 25,9	0 0	7 25,9	0 0	8 29,6	3 11,1	3 11,1	8 29,6	1 3,7		

1, con significación media; 2, con significación alta.

Tabla 4.2.6. Signos clínicos observados y puntuación clínica (P.C.) en los gatos FIV⁺ en la V0 en el estudio de Roferon®. Det: determinación; Alter: alteraciones.

Código	Disorexia/Anorexia	Astenia	Deshidratación	Det. condición corporal	Linfoadenomegalia	Alter. de las mucosas	Polidipsia/Poliuria	Conjuntivitis	Queratitis	Lesiones orales	Alter. digestivas	Lesiones cutáneas	Alter. respiratorias	Alter. neurológicas	Total signos clínicos	P.C.
FIV-01															0	0
FIV-02		1			2								1		3	4
FIV-03	1	1				1									3	3
FIV-04					1					1		1			3	3
FIV-05															0	0
FIV-06	1	1				1				1	1				5	5
FIV-07	1	1				1		2					1		5	6
FIV-08	1							2	2	2					4	7
FIV-09	1					1									2	2
FIV-10	1					1				2					3	4
FIV-11															0	0
FIV-12															0	0
FIV-13	1	1		1			1					1			5	5
FIV-14	1	1		1	2			2				1	1		7	9
FIV-15	1	1			2	1				2					5	7
FIV-16										2					1	2
FIV-17	1	1				1						1			4	4
FIV-18															0	0
FIV-19			1					2		2			1		4	6
FIV-20	1	1		1		1					1		1		6	6
FIV-21	1	1		1		1				2					5	6
FIV-22	1			1							1				3	3
FIV-23															0	0
FIV-24	1	1			2					2					4	6
FIV-25															0	0
FIV-26	1	1		1				2					2		5	7
FIV-27	1				2								1		3	4
FIV-28															0	0
FIV-29	1	1													2	2
FIV-30										2					1	2
FIV-31															0	0
n	17	13	1	6	6	9	1	5	1	10	3	4	7	0		
%	54,8	41,9	3,2	19,4	19,4	29,0	3,2	16,1	3,2	32,3	9,7	12,9	22,6	0		

1, con significación media; 2, con significación alta

Independientemente del tipo de infección, los signos que se presentaron con mayor frecuencia en la población estudiada fueron disorexia (en 44,8% de los gatos), astenia (en 37,9%) y lesiones orales, como gingivostomatitis (en 31,0%) (Tabla 4.2.7. y Figura 4.2.4.). Más de un 25% de los gatos tenían palidez de mucosas, y en el caso de los gatos FeLV⁺ además, más de un 25% de los gatos presentaron conjuntivitis y alteraciones respiratorias. La linfadenomegalia se observó en el 18,5% de los gatos FeLV⁺ y en el 19,4% de los gatos FIV⁺ (Tabla 4.2.7.).

Tabla 4.2.7. Número y porcentaje de gatos FeLV⁺ y FIV⁺ y signos clínicos estudiados en la V0 en el estudio de Roferon®.

Signos clínicos	FeLV ⁺ n=27	FIV ⁺ n=31	Total n=58
Disorexia	9 (33,3%)	17 (54,8%)	26 (44,8%)
Astenia	9 (33,3%)	13 (41,9%)	22 (37,9%)
Lesiones orales	8 (29,6%)	10 (32,3%)	18 (31,0%)
Alt. de las mucosas	7 (25,9%)	9 (29,0%)	16 (27,6%)
Alteraciones respiratorias	8 (29,6%)	7 (22,6%)	15 (25,9%)
Conjuntivitis	7 (25,9%)	5 (16,1%)	12 (20,7%)
Deterioro condición corporal	5 (18,5%)	6 (19,4%)	11 (19,0%)
Linfadenomegalia	5 (18,5%)	6 (19,4%)	11 (19,0%)
Lesiones cutáneas	3 (11,1%)	4 (12,9%)	7 (12,1%)
Alteraciones digestivas	3 (11,1%)	3 (9,7%)	6 (10,3%)
Deshidratación	1 (3,7%)	1 (3,2%)	2 (3,5%)
Poliuria/Polidipsia	0	1 (3,2%)	1 (1,7%)
Queratitis	0	1 (3,2%)	1 (1,7%)
Alteraciones neurológicas	1 (3,7%)	0	1 (1,7%)

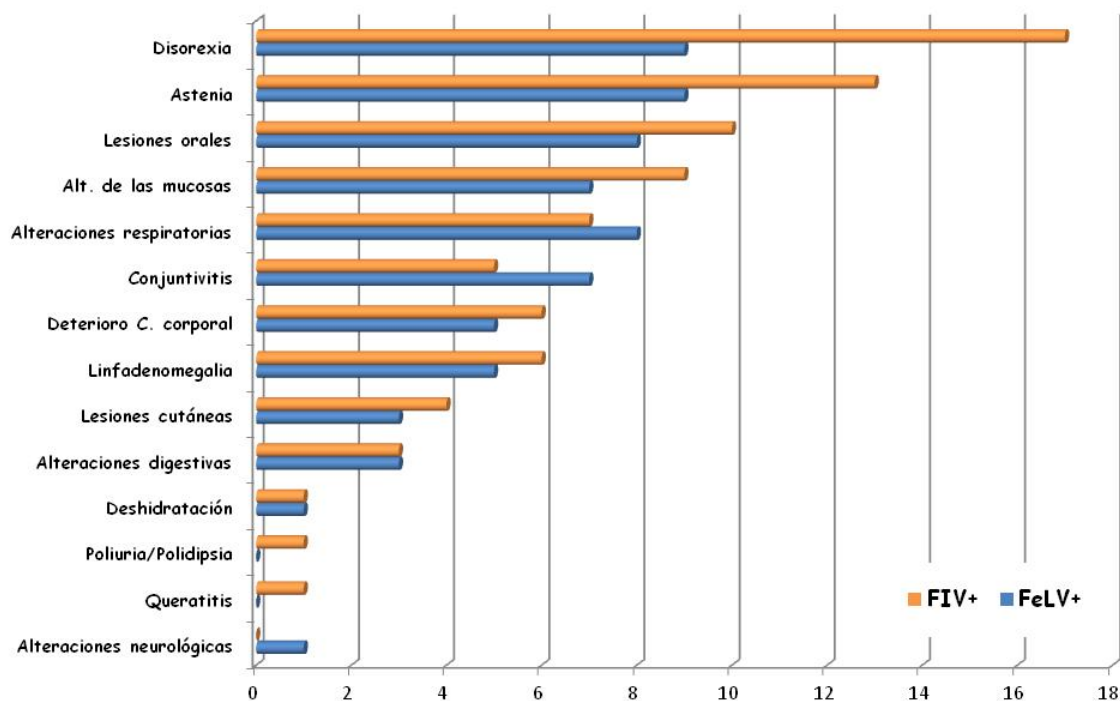


Figura 4.2.4. Porcentaje de gatos FeLV⁺ y FIV⁺ con cada uno de los signos clínicos durante la V0 en el estudio de Roferon®.

No se observaron diferencias significativas en el rango de puntuación clínica, en la media de la puntuación clínica total de todos los gatos infectados o en la media de la puntuación clínica de aquéllos que presentaron signos clínicos entre los gatos FeLV⁺ y FIV⁺ (Tabla 4.2.8.).

Tabla 4.2.8. Rango y medias de la puntuación clínica de los gatos FeLV⁺ y FIV⁺ en la V0 en el estudio de Roferon®.

Puntuación clínica	FeLV ⁺	FIV ⁺
Rango	0-13	0-9
Media aritmética total	3,44	3,32
Media aritmética de gatos con signos clínicos	5,67	5,15

Como ya se describió en Material y Métodos (Apartado 3.2.3.), se dividieron los gatos infectados en cuatro Grupos dependiendo de los signos clínicos y las alteraciones biopatológicas observadas. En ningún caso se registraron gatos sin alteración clínica y con todos los valores biopatológicos analizados dentro de los parámetros de normalidad, por lo que se redujeron a tres los Grupos Clínicos (G.C.) analizados. El 34,5% de los gatos con infección simple no presentaron signos clínicos evidentes pero tenían alguna alteración en la analítica sanguínea (Grupo 1); el 36,2% además de alteraciones biopatológicas presentaban una puntuación clínica (P.C.) inferior o igual a 5 (Grupo 2), y el 29,3% restante tuvo una P.C. 6 o superior a 6 (Grupo 3) (Tabla 4.2.9.).

Al subdividir la población según el tipo de infección y estimar la proporción de cada G.C., se observó que el 40,7% de los gatos FeLV⁺ no presentaban signos clínicos (Grupo 1), mientras que el porcentaje en el grupo de gatos FIV⁺ supuso un 29,0%. Entre los gatos que presentaron signos clínicos, el porcentaje de gatos FeLV⁺ en el Grupo 2 fue inferior al de FIV⁺ (29,6% y 41,9%, respectivamente), mientras que en el Grupo 3 los porcentajes fueron muy similares en ambas infecciones (29,6% en gatos FeLV⁺ y 29,0% en FIV⁺) (Tabla 4.2.9.). Estas diferencias no fueron estadísticamente significativas.

Tabla 4.2.9. Distribución por Grupos Clínicos de las dos infecciones por retrovirus en la V0 en el estudio de Roferon®.

Grupo Clínico	FeLV ⁺ n (%)	FIV ⁺ n (%)	TOTAL n (%)
1	11 (40,7)	9 (29,0)	20 (34,5)
2	8 (29,6)	13 (41,9)	21 (36,2)
3	8 (29,6)	9 (29,0)	17 (29,3)

De igual modo, al estudiar la edad de los gatos con respecto al G.C. asignado se apreció que para los gatos FeLV⁺ los individuos de un año fueron los más representados en el Grupo 1 (4 gatos, 36,4%), tres años en el Grupo 2 (3 gatos, 37,5%) y menos de un año en el Grupo 3 (8 gatos, 62,5%). Los gatos jóvenes representaron, por tanto, el 62,5% de los gatos FeLV⁺ del Grupo 3, el 18,2% del Grupo 1 y el 12,5% del Grupo 2 ($p < 0,05$) (Figura 4.2.5.). En los gatos FeLV⁺ el 75,0% de los gatos jóvenes y el 52,6% de los adultos presentaban signos clínicos; de ellos el 83,3% y 37,5%, respectivamente, pertenecían al Grupo 3.

En los gatos FIV⁺ la edad más representada en todos los grupos clínicos fue la de tres años: tres gatos en el Grupo 1 (33,3%), tres en el Grupo 2 (23,1%) y dos gatos en el Grupo 3 (22,2%). En el Grupo 2 también hubo tres individuos con menos de un año de edad. Los tres gatos jóvenes FIV⁺ pertenecían al Grupo 2 (FIV-02, 10, 27). El 34,8% de los FIV⁺ entre uno y siete años presentaban signos clínicos, porcentaje que aumentaba hasta el 83,3% en los gatos con más de siete años de edad (Figura 4.2.5.).

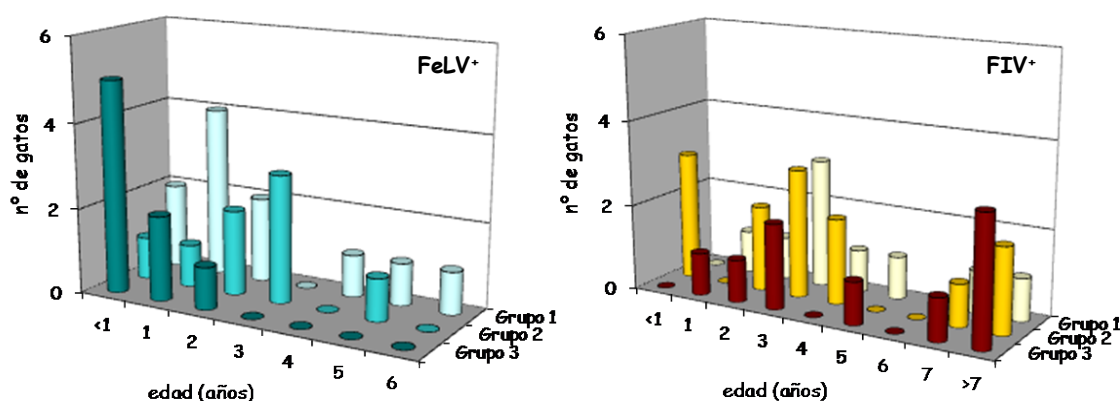


Figura 4.2.5. Distribución de los G.C. de los gatos FeLV⁺ y FIV⁺ según la edad durante la V0 en el estudio de Roferon®.

En ambas infecciones se observó que la mayoría de los gatos machos, castrados o no, presentaron signos clínicos (81,8% en los gatos FeLV⁺ y 75,0% en FIV⁺), mientras que en el caso de las hembras el porcentaje con signos clínicos fue del 43,7% para los gatos FeLV⁺ y el 63,6% para los FIV⁺ (Tabla 4.2.10.). En el caso de la infección por FeLV la diferencia con las hembras fue estadísticamente significativa ($p < 0,05$). En los gatos FeLV⁺ la diferencia en la P.C. media entre machos y hembras fue mayor (4,00 y 3,06, respectivamente) que en los gatos FIV⁺, donde la P.C. media fue similar (3,55 y 3,20, respectivamente).

Tabla 4.2.10. Distribución por sexos y presencia de signos clínicos de los gatos FeLV⁺ y FIV⁺ en la V0 en el estudio de Roferon®.

Distribución por sexos		Sin signos clínicos n (%)	Con signos clínicos n (%)
FeLV ⁺	♀ (16)	9 (56,3)	7 (43,7)
	♂ (11)	2 (18,2)	9 (81,8)
FIV ⁺	♀ (11)	4 (36,4)	7 (63,6)
	♂ (20)	5 (25,0)	15 (75,0)

Tabla 4.2.11. Distribución por sexos y estado reproductivo de los gatos FeLV⁺ y FIV⁺ en la V0 en el estudio de Roferon®. M.C., macho castrado; M.E., macho entero; H.C., hembra castrada; H.E., hembra entera.

Infección	Sexo (n)	Sin signos clínicos (Grupo 1) n (%)	Con signos clínicos (Grupo 2+3) n (%)
FeLV ⁺	H.C. (10)	6 (60,0)	4 (40,0)
	H.E. (6)	3 (50,0)	3 (50,0)
	M.C. (8)	1 (12,5)	7 (87,5)
	M.E. (3)	1 (33,3)	2 (66,7)
FIV ⁺	H.C. (7)	2 (28,6)	5 (71,4)
	H.E. (4)	2 (50,0)	2 (50,0)
	M.C. (14)	4 (28,6)	10 (71,4)
	M.E. (6)	1 (16,7)	5 (83,3)

Al subdividir en animales castrados y no castrados, aproximadamente la mitad (40-50%) de las gatas de cada grupo presentó signos clínicos (Grupo 2 y 3) y la otra mitad no los presentó (Grupo 1), salvo en el caso de las hembras castradas FIV⁺ donde el grupo con signos clínicos representaba el 71,4%, aunque esta diferencia no fue estadísticamente significativa (Tabla 4.2.11., Figura 4.2.5.).

En el caso de los machos, en todos los subgrupos en ambas infecciones el porcentaje de gatos con signos clínicos fue mayor que el de gatos sin signos clínicos (66,7-83,3%) (Tabla 4.2.11.).

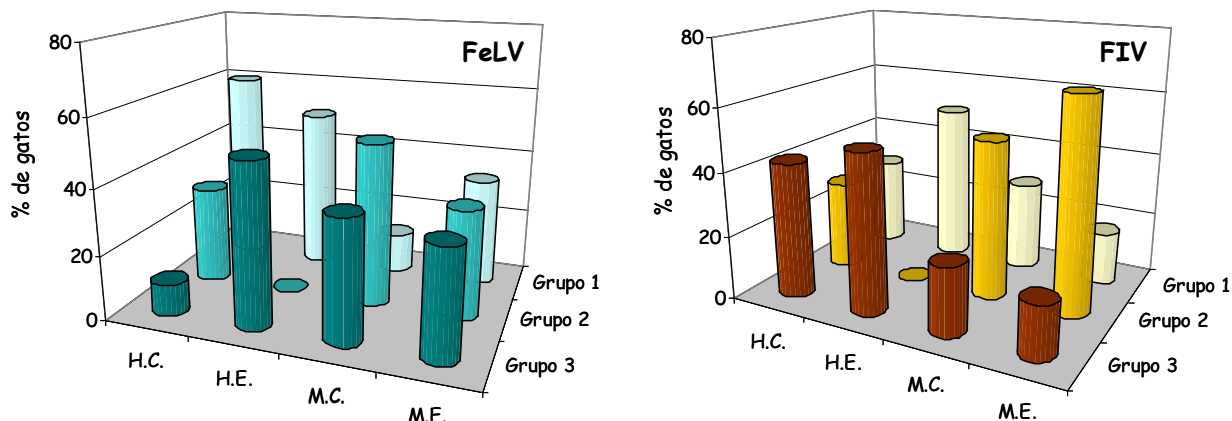


Figura 4.2.6. Distribución de los G.C. de los gatos FeLV⁺ y FIV⁺ según el sexo y estado reproductivo durante la VO en el estudio de Roferon®. M.C., macho castrado; M.E., macho entero; H.C., hembra castrada; H.E., hembra entera.

4.2.3. Situación inicial de la analítica sanguínea de la población felina

4.2.3.1. Hemograma

El análisis de la serie roja es muy importante en ambas infecciones ya que se considera como una de las principales alteraciones sanguíneas que se producen en los gatos FeLV⁺ y FIV⁺. El estudio se centró en los tres parámetros más importantes, que son el hematocrito (Htc.), concentración de hemoglobina (Hgb.) y recuento de eritrocitos (Eritro.). Además, se calcularon el volumen corpuscular medio (VCM), la concentración de hemoglobina media (CHM), la concentración corpuscular media de hemoglobina (CCMH), se registró la presencia de policromatofilia y calculó el índice de reticulocitos. Todos los valores se compararon con los valores de referencia (Apartado 3.2.7.).

Independientemente del tipo de infección, los valores VCM, CMH, CCMH, el grado de policromatofilia y el índice de reticulocitos se encontraban dentro de los valores de referencia en todos los gatos, excepto FeLV-09 y FIV-21, en los que estaban disminuidos.

Sin embargo, sí hubo un número significativo de gatos con los valores de Htc., Hgb. y Eritro. alterados, sobre los que se centró este estudio (Tablas 4.2.12. y 4.2.13.). En base a esto, en los animales que presentaban anemia, ésta fue normocítica, normocrómica, sin policromatofilia y con índice de reticulocitos normal, y por tanto, de tipo no regenerativa. En todos los gatos se registró una anemia leve (Htc. 26% - 20%) o moderada (Htc. 20% - 14%), salvo en el gato FeLV-10 que presentó anemia grave (Htc. <14%) (Tablas 4.2.12. y 4.2.13.).

El Htc. fue el valor del hemograma que apareció alterado en un porcentaje mayor de animales (33,3% de gatos FeLV⁺ y 35,5% de gatos FIV⁺); los porcentajes de alteración de Hgb. fueron ligeramente inferiores, 29,6% en los gatos FeLV⁺ y 32,3% en los FIV⁺ (Tabla 4.2.14.), ya que FeLV-21 y FIV-11 presentaron el valor de Htc. alterado pero el de Hgb. dentro de la normalidad. El valor de recuento Eritro. estaba disminuido en un menor número de gatos en ambas infecciones, 22,2% de los gatos FeLV⁺ y 19,4% de los FIV⁺ (Tabla 4.2.15.).

Todos los gatos con la Hgb. alterada presentaron una disminución del Htc., y todos los gatos con recuentos de Eritro. disminuidos presentaron valores de Hgb. y Htc. por debajo de la normalidad.

Tabla 4.2.12. Resultados del hemograma en los gatos FeLV⁺ en la V0 en el estudio de Roferon®. Htc., hematocrito; Hgb., concentración de hemoglobina; Eritro., recuento de eritrocitos.

G.C.	Código	Htc.	Hgb.	Eritro.
1	FeLV-03	n	n	n
	FeLV-07	↓↓	↓	n
	FeLV-09	↓	↓	↓
	FeLV-13	n	n	n
	FeLV-16	n	n	n
	FeLV-17	n	n	n
	FeLV-18	n	n	n
	FeLV-21	↓	n	n
	FeLV-22	n	n	n
	FeLV-26	n	n	n
	FeLV-27	↓	↓	n
2	FeLV-02	n	n	n
	FeLV-04	n	n	n
	FeLV-05	n	n	n

G.C.	Código	Htc.	Hgb.	Eritro.
2 (cont.)	FeLV-08	n	n	n
	FeLV-14	n	n	n
	FeLV-15	↓↓	↓	↓
	FeLV-19	n	n	n
	FeLV-24	↓↓	↓	↓
3	FeLV-01	↓↓	↓	↓
	FeLV-06	n	n	n
	FeLV-10	↓↓↓	↓	↓
	FeLV-11	n	n	n
	FeLV-12	n	n	n
	FeLV-20	↓	↓	↓
	FeLV-23	n	n	n
	FeLV-25	n	n	n

- Htc.: n, ≥26%; ↓, 26% - 20%; ↓↓, 20% - 14%; ↓↓↓, <14%.
- Hgb.: n, ≥15g/dl; ↓, <15g/dl
- Eritro.: n, ≥5x10⁶ eritro./μl; ↓, <5x10⁶ eritro./μl

Tabla 4.2.13. Resultados del hemograma en los gatos FIV⁺ en la V0 en el estudio de Roferon®. Htc., hematocrito; Hgb., concentración de hemoglobina; Eritro., recuento de eritrocitos.

G.C.	Código	Htc.	Hgb.	Eritro.
1	FIV-01	n	n	n
	FIV-05	n	n	n
	FIV-11	↓	n	n
	FIV-12	n	n	n
	FIV-18	↓	↓	↓
	FIV-23	n	n	n
	FIV-25	n	n	n
	FIV-28	n	n	n
	FIV-31	↓	↓	n
2	FIV-02	n	n	n
	FIV-03	n	n	n
	FIV-04	n	n	n
	FIV-06	n	n	n
	FIV-09	↓↓	↓	↓
	FIV-10	n	n	n
	FIV-13	↓↓	↓	↓

G.C.	Código	Htc.	Hgb.	Eritro.
2 (cont.)	FIV-16	n	n	n
	FIV-17	n	n	n
	FIV-22	n	n	n
	FIV-27	n	n	n
	FIV-29	↓	↓	↓
	FIV-30	↓	↓	n
3	FIV-07	n	n	n
	FIV-08	↓	↓	n
	FIV-14	n	n	n
	FIV-15	↓	↓	↓
	FIV-19	↓	↓	n
	FIV-20	n	n	n
	FIV-21	↓	↓	↓
	FIV-24	n	n	n
	FIV-26	n	n	n

- Htc.: n, ≥26%; ↓, 26% - 20%; ↓↓, 20% - 14%; ↓↓↓, <14%.
- Hgb.: n, ≥15g/dl; ↓, <15g/dl
- Eritro.: n, ≥5x10⁶ eritro./μl; ↓, <5x10⁶ eritro./μl

Tabla 4.2.14. Número y porcentaje de gatos FeLV⁺ y FIV⁺ que presentaron alteraciones en el hemograma en la V0 en el estudio de Roferon®. Htc., hematocrito; Hgb., concentración de hemoglobina; Eritro., recuento de eritrocitos.

	FeLV ⁺ n (%)	FIV ⁺ n (%)
Htc.	9 (33,3)	11 (35,5)
Hgb.	8 (29,6)	10 (32,3)
Eritro.	6 (22,2)	6 (19,4)

Al analizar las alteraciones según el estado reproductivo de los gatos se observó que en FIV⁺ el 47,6% de los gatos castrados (machos y hembras) tenían valores de hematocrito disminuidos, en un porcentaje superior que en los gatos enteros (10,0%) ($p < 0,05$). Del mismo modo, un mayor porcentaje de gatos castrados (42,9%) y enteros (10,0%) tuvieron la concentración de hemoglobina disminuida ($p < 0,10$) (Tabla 4.2.15.). Además, se observó un mayor porcentaje de alteración del recuento de eritrocitos en las hembras (36,4%) que en los machos (10,0%) ($p < 0,10$) (Tabla 4.2.16.) En lo que respecta al G.C. no se observaron diferencias significativas, ni entre los gatos con signos clínicos (Grupos 2 y 3) y los gatos sin signos clínicos (Grupo 1) (Tabla 4.2.18.).

Tabla 4.2.15. Porcentaje de gatos FeLV⁺ y FIV⁺ de cada estado reproductivo que presentaron alteraciones en el hemograma en la V0 en el estudio de Roferon®. Htc., hematocrito; Hgb., concentración de hemoglobina; Eritro., recuento de eritrocitos.

Infección	Sexo	Htc. n (%)	Hgb. n (%)	Eritro. n (%)
FeLV ⁺	castrado (18)	5 (27,8)	5 (27,7)	5 (27,8)
	entero (9)	4 (44,4)	3 (33,3)	2 (22,2)
FIV ⁺	castrado (21)	10 (47,6)	9 (42,9)	5 (23,8)
	entero (10)	1 (10,0)	1 (10,0)	1 (10,0)

Tabla 4.2.16. Número y porcentaje de gatos FeLV⁺ y FIV⁺ de cada sexo que presentaron alteraciones en el hemograma en la V0 en el estudio de Roferon®. Htc., hematocrito; Hgb., concentración de hemoglobina; Eritro., recuento de eritrocitos.

Infección	Sexo	Htc. n (%)	Hgb. n (%)	Eritro. n (%)
FeLV ⁺	♀ (16)	5 (31,2)	4 (25,0)	3 (18,8)
	♂ (11)	4 (36,4)	4 (36,4)	4 (36,4)
FIV ⁺	♀ (11)	4 (36,4)	4 (36,4)	4 (36,4)
	♂ (20)	7 (35,0)	6 (30,0)	2 (10,0)

Tabla 4.2.17. Número y porcentaje de gatos FeLV⁺ y FIV⁺ de cada sexo y estado reproductivo que presentaron alteraciones en el hematocrito en la V0 en el estudio de Roferon®.

Infección	Sexo	Htc. n (%)
FeLV ⁺	♀ castradas (10)	2 (20,2)
	♂ castrados (8)	3 (37,5)
	♀ enteras (6)	3 (50,0)
	♂ enteros (10)	1 (10,0)

Infección	Sexo	Htc. n (%)
FIV ⁺	♀ castradas (7)	3 (42,9)
	♂ castrados (14)	7 (50,0)
	♀ enteras (4)	1 (25,0)
	♂ enteros (6)	0 (-)

En los gatos infectados por FeLV no se observaron diferencias estadísticamente significativas en cuanto a los valores del hematocrito entre ambos sexos, estados reproductivos o G.C. Sin embargo, hubo un mayor porcentaje de hembras enteras con el hematocrito disminuido (50,0%) que hembras castradas (20,2%) y

machos (36,4%) (Tablas 4.2.16. y 4.2.17.). De igual modo, se observó que los gatos con signos clínicos (Grupos 2 y 3) tuvieron una mayor tendencia ($p < 0,20$) a presentar un recuento de eritrocitos por debajo de los índices de normalidad (31,3%) que aquellos gatos sin signos clínicos (Grupo 1) (9,1%) (Tabla 4.2.18.).

Tabla 4.2.18. Número y porcentaje de gatos FeLV⁺ y FIV⁺ con o sin signos clínicos que presentaron alteraciones en el hemograma en la VO en el estudio de Roferon®. Htc., hematocrito; Hgb., concentración de hemoglobina; Eritro., recuento de eritrocitos.

Infección	Signos clínicos (G.C)	(n)	Htc. n (%)	Hgb. n (%)	Eritro. n (%)
FeLV ⁺	Sin signos clínicos (G.C 1)	(11)	4 (36,4)	3 (27,3)	1 (9,1)
	Con signos clínicos (G.C. 2+3)	(16)	5 (31,3)	5 (31,3)	5 (31,3)
FIV ⁺	Sin signos clínicos (G.C. 1)	(9)	3 (33,3)	2 (22,2)	1 (11,1)
	Con signos clínicos (G.C. 2+3)	(22)	8 (36,4)	8 (36,4)	5 (22,7)

4.2.3.2. Formula leucocitaria

La fórmula leucocitaria se analizó durante el presente estudio para conocer la situación inicial y la evolución de las células responsables de la inmunidad durante la infección por FeLV y FIV. Durante el estudio de la fórmula leucocitaria se observaron porcentajes muy bajos y no significativos de alteración en número de eosinófilos y basófilos. Por tanto, se realizó un estudio y análisis más profundo de las dos poblaciones leucocitarias más afectadas en estas dos retrovirusos: los neutrófilos y los linfocitos. El análisis de las poblaciones se basó siempre en el número total de células y no en el porcentaje, y se comparó con los valores de referencia del laboratorio (Apartado 3.2.7.). A partir de éstos se estableció si hubo aumento o disminución en el número de células para cada población celular estudiada.

Tabla 4.2.19. Resultados de la fórmula leucocitaria en los gatos FeLV⁺ durante la VO en el estudio de Roferon®. Leuc., número de leucocitos; Ntrf., número de neutrófilos; Linf., número de linfocitos.

G.C.	Código	Leuc.	Ntrf.	Linf.
1	FeLV-03	↓	↓	↓
	FeLV-07	↓	↓	↓
	FeLV-09	↓	n	↓
	FeLV-13	n	n	n
	FeLV-16	↓	↓	↓
	FeLV-17	n	n	n
	FeLV-18	n	↓	n
	FeLV-21	n	n	n
	FeLV-22	n	n	n
	FeLV-26	n	↓	n
	FeLV-27	n	n	n
2	FeLV-02	n	n	n
	FeLV-04	n	n	n
	FeLV-05	n	n	n

G.C.	Código	Leuc.	Ntrf.	Linf.
2 (cont.)	FeLV-08	n	n	n
	FeLV-14	↓	n	n
	FeLV-15	n	↓	n
	FeLV-19	n	n	n
	FeLV-24	n	n	n
3	FeLV-01	n	n	↓
	FeLV-06	n	n	n
	FeLV-10	n	↓	↑
	FeLV-11	↓	↓	n
	FeLV-12	n	↓	↑
	FeLV-20	n	n	n
	FeLV-23	↓	↓	n
	FeLV-25	n	n	n

- Leuc.: n, ≥ 5.500 y ≤ 19.500 Leuc./ μ l; ↓, < 5.500 Leuc./ μ l; ↑, > 19.500 Leuc./ μ l
- Ntrf.: n, ≥ 2.500 y ≤ 12.500 Ntrf./ μ l; ↓, < 2.500 Ntrf./ μ l; ↑, > 12.500 Ntrf./ μ l
- Linf.: n, ≥ 1.500 y ≤ 7.700 Linf./ μ l; ↓, < 1.500 Linf./ μ l; ↑, > 7.700 Linf./ μ l

Como se muestra en las Tablas 4.2.19. y 4.2.20., las alteraciones de la fórmula leucocitaria para ambas infecciones fueron diferentes. El porcentaje de individuos con alguna alteración en la fórmula leucocitaria fue superior en los gatos FIV⁺ que en los FeLV⁺ (64,5% y 48,0%, respectivamente). En general, en ambas retrovirus se produjeron principalmente procesos citopénicos más que aumentos en las poblaciones celulares, siendo la neutropenia la alteración más frecuente (32,3% de los gatos FIV⁺ y 37,0% de los FeLV⁺) (Tabla 4.2.21.).

En los gatos FeLV⁺ no se observaron casos de neutrofilia y solamente se registraron dos casos de linfocitosis (FeLV-10 y -12; 7,4%) acompañados de neutropenia; en ambos casos fueron gatos incluidos en el Grupo 3 (Tabla 4.2.19.).

En el grupo de gatos positivos a FIV el porcentaje de neutrofilia (19,3%) fue superior al de linfocitosis (FIV-21; 3,2%) (Tabla 4.2.21.). Aunque no fue estadísticamente significativo, el 83,3% de las neutrofilias se produjeron en gatos con signos clínicos (Grupos 2 y 3).

Tabla 4.2.20. Resultados de la fórmula leucocitaria en los gatos FIV⁺ durante la V0 en el estudio de Roferon®. Leuc., número de leucocitos; Ntrf., número de neutrófilos; Linf., número de linfocitos.

G.C.	Código	Leuc.	Ntrf.	Linf.
1	FIV-01	↓	↓	n
	FIV-05	↓	↓	n
	FIV-11	n	↓	n
	FIV-12	n	n	n
	FIV-18	↑	↑	↓
	FIV-23	n	n	n
	FIV-25	n	n	n
	FIV-28	n	n	n
	FIV-31	n	n	↓
2	FIV-02	n	n	n
	FIV-03	n	n	n
	FIV-04	n	n	n
	FIV-06	↑	↑	n
	FIV-09	↓	↓	n
	FIV-10	n	n	n
	FIV-13	n	↑	↓
2 (cont.)	FIV-16	n	n	↓
	FIV-17	n	n	n
	FIV-22	↓	↓	n
	FIV-27	n	↑	n
	FIV-29	n	↓	n
	FIV-30	n	n	n
3	FIV-07	n	n	n
	FIV-08	↑	↑	n
	FIV-14	n	↓	n
	FIV-15	n	↓	n
	FIV-19	↓	n	↓
	FIV-20	n	↓	n
	FIV-21	↑	↑	↑
	FIV-24	↓	↓	↓
	FIV-26	↓	n	n

- Leuc.: n, ≥5.500 y ≤19.500 Leuc./μl; ↓, <5.500 Leuc./μl; ↑, >19.500 Leuc./μl
- Ntrf.: n, ≥2.500 y ≤12.500 Ntrf./μl; ↓, <2.500 Ntrf./μl; ↑, >12.500 Ntrf./μl
- Linf.: n, ≥1.500 y ≤7.700 Linf./μl; ↓, <1.500 Linf./μl; ↑, >7.700 Linf./μl

Tabla 4.2.21. Número y porcentaje de gatos FeLV⁺ y FIV⁺ que presentaron alteraciones en el leucograma y la fórmula leucocitaria durante la V0 en el estudio de Roferon®. Alteraciones: LeP, leucopenia; LeC, leucocitosis; NeP, neutropenia; NeF, neutrofilia; LiP, linfopenia; LiC, linfocitosis.

Infección	Leucograma n (%)	Leucocitos n (%)		Neutrófilos n (%)		Linfocitos n (%)	
		LeC	LeP	NeF	NeP	LiC	LiP
FeLV ⁺	13 (48,0)	0	7 (25,9)	0	10 (37,0)	2 (7,4)	5 (18,5)
FIV ⁺	20 (64,5)	4 (12,9)	7 (22,6)	6 (19,3)	10 (32,3)	1 (3,2)	6 (22,2)

Aunque hubo un mayor porcentaje de gatos FIV⁺ con alteraciones en los leucocitos que en los FeLV⁺; en los animales FeLV⁺ que mostraban alteración aparecían afectadas más de una población celular. En los gatos FeLV⁺ el 50,0% de las neutropenias se asociaron con alteraciones de la población linfocítica (linfocitosis y linfopenias), y el 60,0% de las linfopenias se asociaron a neutropenia. Por el contrario, en los gatos FIV⁺ las neutropenias se acompañaron de valores normales de linfocitos en el 90,0% de los casos, y sólo en un gato (FIV-24) la linfopenia se asoció a neutropenia (Tabla 4.2.22.).

Tabla 4.2.22. Número y porcentaje de gatos FeLV⁺ y FIV⁺ con alteraciones asociadas a la fórmula leucocitaria durante la V0 en el estudio de Roferon®.

Infección	Alteración (n)	Asociada a:	n (%)	Código (FeLV- o FIV-)
FeLV ⁺	neutropenia (10)	nº linfocitos normal	5 (50,0)	11, 15, 18, 23, 26
		linfocitosis	2 (20,0)	10, 12
		linfopenia	3 (30,0)	03, 07, 16
	linfopenia (5)	nº neutrófilos normal	2 (40,0)	01,09
		neutrofilia	0	-
		neutropenia	3 (60,0)	03, 07, 16
FIV ⁺	neutropenia (10)	nº linfocitos normal	9 (90,0)	01, 05, 09, 11, 14, 15, 20, 22, 29
		linfocitosis	0	-
		linfopenia	1 (10,0)	24
	linfopenia (6)	nº neutrófilos normal	3 (50,0)	16, 19, 31
		neutrofilia	2 (33,3)	13, 18
		neutropenia	1 (16,7)	24

Teniendo en cuenta solamente los gatos con alguna alteración en el recuento de linfocitos y neutrófilos, se observó que en los gatos FeLV⁺ hubo una mayor tendencia ($p < 0,20$) a presentar ambas poblaciones celulares afectadas con respecto a los gatos FIV⁺ (58,3% en gatos FeLV⁺ frente a 21,1% de los FIV⁺) (Tabla 4.2.23.).

Tabla 4.2.23. Número y porcentaje de gatos FeLV⁺ y FIV⁺ que presentan uno o ambos parámetros de la fórmula leucocitaria estudiados (Ntrf., número de neutrófilos; Linf., número de linfocitos) con respecto al total de los gatos que presentan esas poblaciones celulares alteradas durante la V0 en el estudio de Roferon®.

Infección	Alteración Ntrf. y/o Linf. n (%)	Alteración Ntrf. o Linf. n (%)	Alteración Ntrf. + Linf. n (%)
FeLV ⁺	12	5 (41,7)	7 (58,3)
FIV ⁺	19	15 (79,0)	4 (21,0)

Finalmente, se analizaron los resultados de la fórmula leucocitaria en los gatos para ambas infecciones según el G.C. y no se observaron diferencias estadísticamente significativas (Tabla 4.2.24.). Tampoco se observaron diferencias estadísticamente significativas para las variables sexo y edad.

Tabla 4.2.24. Número y porcentaje de gatos FeLV⁺ y FIV⁺ de cada G.C. que presentaron alteraciones en la fórmula leucocitaria durante la V0 en el estudio de Roferon®.

Infección (n)	G.C. (n)	Leucocitos n (%)		Neutrófilos n (%)		Linfocitos n (%)	
		Leucocitosis	Leucopenia	Neutrofilia	Neutropenia	Linfocitosis	Linfopenia
FeLV ⁺ (27)	1 (11)	0	4 (36,3)	0	5 (45,5)	0	4 (36,3)
	2 (8)	0	1 (12,5)	0	1 (12,5)	0	0
	3 (8)	0	2 (25,0)	0	4 (50,0)	2 (25,0)	1 (12,5)
FIV ⁺ (31)	1 (9)	1 (11,1)	2 (22,2)	1 (11,1)	3 (33,3)	0	2 (22,2)
	2 (13)	1 (7,7)	2 (15,4)	3 (23,1)	3 (23,1)	0	2 (15,4)
	3 (9)	2 (22,2)	3 (33,3)	2 (22,2)	4 (44,4)	1 (11,1)	2 (22,2)

4.2.3.3. Perfil bioquímico

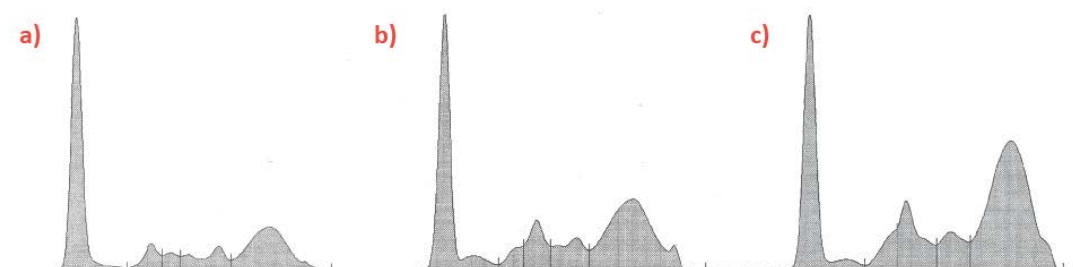
Se analizaron tres parámetros bioquímicos en el plasma de los gatos incluidos en el estudio, indicativos de una posible alteración renal (urea y creatinina) y/o hepática (ALT). En la población de estudio se registraron muy pocas alteraciones de estos parámetros.

Los valores de urea aparecieron alterados en el 18,5% de los gatos FeLV⁺ (FeLV-01, -06, -08, -18, -26) y en el 22,6% de los FIV⁺ (FIV-04, -09, -13, -15, -22, -29, -31). Esta alteración se acompañó en dos gatos FIV⁺ de niveles elevados de creatinina (FIV-15, -22) y de ALT en un gato (FIV-13). Los gatos FeLV⁺ con alteraciones en los índices de urea pertenecían a los tres G.C. (FeLV-18 y -26 al Grupo 1, FeLV-08 al Grupo 2, y FeLV-01 y -06 al Grupo 3) y no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre ambos sexos y los dos grupos de edad.

Sin embargo, en FIV⁺ la mayoría de los gatos con alteraciones en los valores de urea pertenecían a los Grupos 2 y 3, con signos clínicos (FIV-04, 09, 13, 15, 22, 29) y tan solo el gato FIV-31 no presentaba signos clínicos (Grupo 1), aunque no hubo diferencias estadísticamente significativas. Tampoco se observaron diferencias estadísticamente significativas entre ambos sexos y ambos grupos de edad.

4.2.3.4. Análisis y electroforesis de las proteínas plasmáticas (proteinograma)

Los resultados del análisis de las proteínas plasmáticas de los gatos FeLV⁺ y FIV⁺ se muestran en las Tablas 4.2.25 y 4.2.26, respectivamente, y los proteinogramas tipo de ambas infecciones en la Figura 4.2.7. El análisis del proteinograma evidenció que un 29,6% de gatos FeLV⁺ y un 51,6% de FIV⁺ presentaron hiperproteinemia (Tabla 4.2.27.), siempre relacionada con hipergammaglobulinemia. Sin embargo, el 18,2% de las hipergammaglobulinemias en los gatos FeLV⁺ y el 36,0% en los FIV⁺ no dieron lugar a hiperproteinemias. La hipergammaglobulinemia se observó en un 40,7% de los gatos FeLV⁺ y en un 80,6% de los FIV⁺ (Tabla 4.2.27.). Se evidenciaron diferencias estadísticamente significativas en los porcentajes de alteración de proteínas plasmáticas totales ($p<0,1$) y gammaglobulinas ($p<0,05$) entre los gatos FeLV⁺ y FIV⁺, siendo en ambos casos superiores para FIV⁺ (Tabla 4.2.27.).

**Figura 4.2.7.** Proteinogramas tipo de los gatos b) FeLV⁺ y c) FIV⁺ en relación con un proteinograma tipo de un gato sano a).

Los porcentajes de hipoalbuminemia e hiperalfaglobulinemia fueron muy similares para ambas infecciones retrovirales.

Tabla 4.2.25. Resultados del proteinograma en los gatos FeLV⁺ en la V0 en el estudio de Roferon®.

G.C.	Código	Proteínas totales	Albúmina	Alfa-globulinas	Gamma-globulinas	A/G
1	FeLV-03	n	n	n	n	n
	FeLV-07	n	n	n	n	n
	FeLV-09	n	n	n	↑	n
	FeLV-13	n	n	n	n	n
	FeLV-16	n	n	n	n	n
	FeLV-17	n	n	n	n	n
	FeLV-18	n	n	n	n	n
	FeLV-21	n	n	n	n	n
	FeLV-22	n	n	n	n	n
	FeLV-26	↑	n	n	↑	n
	FeLV-27	↑	n	↑	↑	↓
2	FeLV-02	n	n	n	n	n
	FeLV-04	↑	n	n	↑	↓
	FeLV-05	↑	n	n	↑	↓
	FeLV-08	↑	n	n	↑	↓
	FeLV-14	n	n	n	↑	↓
	FeLV-15	n	n	n	n	n
	FeLV-19	↑	n	n	↑	n
	FeLV-24	n	n	n	↑	n
3	FeLV-01	↑	↓	↑	↑	↓
	FeLV-06	↑	n	n	↑	↓
	FeLV-10	n	n	n	n	n
	FeLV-11	n	n	n	n	n
	FeLV-12	n	n	n	n	n
	FeLV-20	n	n	n	n	n
	FeLV-23	n	n	n	n	n
	FeLV-25	n	n	n	n	n

- Proteínas totales: n, ≤7,4 g/dl; ↑, >7,4g/dl
- Albúmina: n, ≥2,3 g/dl; ↓, <2,3g/dl
- Alfa-globulinas: n, ≤1,5 g/dl; ↑, >1,5g/dl
- Gamma-globulinas: n, ≤1,5 g/dl; ↑, >1,5g/dl
- A/G: n, ≥0,7; ↓, <0,7

Tabla 4.2.26. Resultados del proteinograma en los gatos FIV⁺ en la V0 en el estudio de Roferon®.

G.C.	Código	Proteínas totales	Albúmina	Alfa-globulinas	Gamma-globulinas	A/G
1	FIV-01	n	n	n	↑	n
	FIV-05	↑	n	n	↑	n
	FIV-11	↑	n	n	↑	n
	FIV-12	n	↓	n	n	↓
	FIV-18	n	n	n	n	n
	FIV-23	↑	n	n	↑	↓
	FIV-25	↑	n	n	↑	↓
	FIV-28	n	n	n	n	n
	FIV-31	n	n	n	↑	n
2	FIV-02	↑	n	n	↑	n
	FIV-03	↑	n	↑	↑	n
	FIV-04	n	n	n	↑	n
	FIV-06	n	n	n	↑	n
	FIV-09	↑	n	n	↑	↓
	FIV-10	n	n	n	n	n
	FIV-13	n	n	n	↑	↓
	FIV-16	n	n	n	n	n
	FIV-17	↑	n	↑	↑	↓
	FIV-22	↑	n	n	↑	n
	FIV-27	↑	n	n	↑	↓
	FIV-29	↑	n	n	↑	n
	FIV-30	n	n	n	↑	↓
3	FIV-07	n	n	n	↑	n
	FIV-08	n	n	n	↑	n
	FIV-14	↑	n	n	↑	↓
	FIV-15	↑	n	n	↑	↓
	FIV-19	n	n	n	n	n
	FIV-20	n	n	n	↑	n
	FIV-21	↑	n	n	↑	↓
	FIV-24	↑	n	n	↑	↓
	FIV-26	↑	n	n	↑	n

- Proteínas totales: n, ≤7,4 g/dl; ↑, >7,4g/dl
- Albúmina: n, ≥2,3 g/dl; ↓, <2,3g/dl
- Alfa-globulinas: n, ≤1,5 g/dl; ↑, >1,5g/dl
- Gamma-globulinas: n, ≤1,5 g/dl; ↑, >1,5g/dl
- A/G: n, ≥0,7; ↓, <0,7

Tabla 4.2.27. Número y porcentaje de gatos FeLV⁺ y FIV⁺ que presentaron alteraciones en el proteinograma durante la V0 en el estudio de Roferon®. *, Diferencias estadísticamente significativas ($p<0,05$) entre los valores de los gatos FeLV⁺ y FIV⁺.

Alteración	FeLV ⁺ (n=27) n (%)	FIV ⁺ (n=31) n (%)
Hiperproteinemia	8 (29,6)*	16 (51,6)*
Hipoalbuminemia	1 (3,7)	1 (3,2)
Hiperalfaglobulinemia	2 (7,4)	2 (6,4)
Hipergammaglobulinemia	11 (40,7)*	25 (80,6)*
Cociente A/G disminuido	7 (25,9)*	12 (38,7)*

Un cociente A/G inferior a 0,7 se observó en un 25,9% de los gatos FeLV⁺ y 38,7% de los FIV⁺ (Tabla 4.2.27.). Aunque la diferencia de porcentaje entre los gatos FeLV⁺ y FIV⁺ fue menor que en el caso de la hipergammaglobulinemia, también fue estadísticamente significativa ($p<0,05$). En todos los gatos excepto en FIV-12, la disminución del índice A/G estuvo ligada a hipergammaglobulinemia, pero el 36,4% de los gatos FeLV⁺ y el 56,0% de los gatos FIV⁺ con hipergammaglobulinemia tenían valores del índice A/G dentro de la normalidad ($\geq 0,7$). El gato FIV-12 fue un caso excepcional, ya que el índice A/G estuvo disminuido por un descenso en la concentración de albúmina y no por un aumento en la concentración de la fracción globulínica. Los cuatro casos de hiperalfaglobulinemia (FeLV-01, -27 y FIV-03, -17) estuvieron asociados a hipergammaglobulinemia.

Tabla 4.2.28. Número y porcentaje de gatos FeLV⁺ y FIV⁺ de cada Grupo Clínico (G.C.) que presentaron alteraciones en el proteinograma durante la V0 en el estudio de Roferon®. * $p<0,1$ entre los valores de G.C. 1 y G.C. 2 + G.C. 3.

Alteración	FeLV ⁺ n (%)			FIV ⁺ n (%)		
	G.C. 1 (n=11)	G.C. 2 (n=8)	G.C. 3 (n=8)	G.C. 1 (n=9)	G.C. 2 (n=13)	G.C. 3 (n=9)
Hiperproteinemia	2 (18,2)	4 (50,0)	2 (25,0)	4 (40,0)	7 (58,3)	5 (55,6)
Hipergammaglobulinemia	3 (27,3)	6 (75,0)	2 (25,0)	6 (66,7)	11 (84,6)	8 (88,8)
Cociente A/G disminuido	1 (9,1)*	4 (50,0)	2 (25,0)	3 (30,0)	5 (41,7)	4 (44,4)

En lo que respecta a la presencia de alteraciones en las proteínas plasmáticas respecto a los G.C., en los gatos FIV⁺ no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre ellos; sin embargo, en los gatos FeLV⁺ sí se observó que los gatos con signos clínicos (Grupos 2 y 3) presentaban con más frecuencia alteraciones en las proteínas plasmáticas con respecto a los gatos sin signos clínicos (Grupo 1). Esta diferencia fue cercana a ser estadísticamente significativa ($p<0,1$) para el cociente A/G (Tabla 4.2.28.).

Comparando ambas infecciones con respecto a los grupos de edad, no existieron diferencias estadísticamente significativas en FIV⁺ entre ambos grupos; sin embargo, en los gatos FeLV⁺ sí se observó una mayor incidencia de hipergammaglobulinemia ($p<0,1$) en los gatos adultos (Tabla 4.2.29.). No se observaron diferencias con respecto a los resultados del proteinograma en relación al sexo o al estado reproductivo para ninguna de las dos infecciones víricas.

Tabla 4.2.29. Número y porcentaje de gatos FeLV⁺ y FIV⁺ de cada grupo de edad que presentaron alteraciones en el proteinograma durante la V0 en el estudio de Roferon®.* p<0,1.

Alteración	FeLV		FIV	
	jóvenes (n=8)	adultos (n=19)	jóvenes (n=3)	adultos (n=29)
Hiperproteinemia	1 (12,5)	7 (36,8)	2 (66,6)	14 (48,3)
Hipergammaglobulinemia	1 (12,5)*	10 (52,6)*	2 (66,6)	23 (79,3)

En todos los gatos FIV⁺ y FeLV⁺, excepto el gato FeLV-18, los niveles elevados de urea se acompañaron de hipergammaglobulinemia. En el caso de la infección por FIV, se observó una correlación positiva moderada ($R=0,56$, $p<0,01$) entre los valores de urea y las gammaglobulinas. Aunque la correlación entre los valores de creatinina y gammaglobulinas fue menor ($R=0,36$), también fue estadísticamente significativa ($p<0,05$) (Figura 4.2.7.).

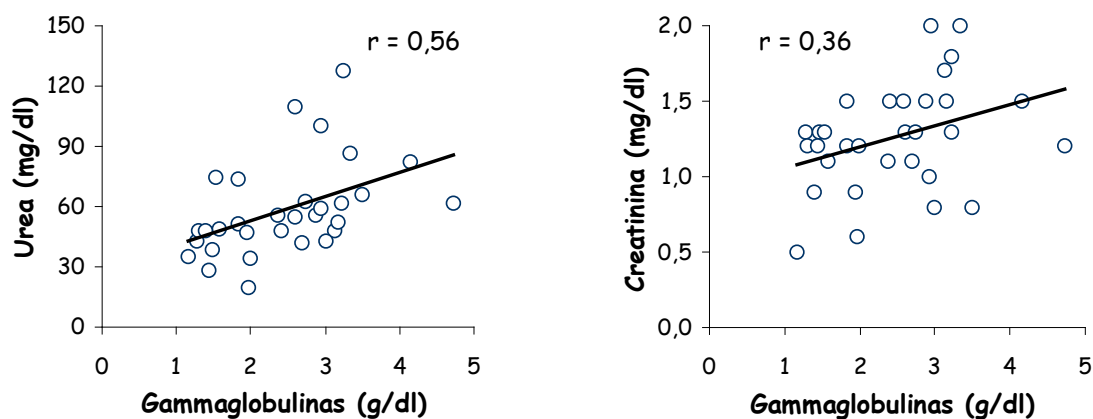


Figura 4.2.8. Correlación entre la concentración de gammaglobulinas y los parámetros renales urea y creatinina de los gatos FIV⁺ en la V0 en el estudio de Roferon®.

4.2.3.5. Cociente de poblaciones CD4⁺/CD8⁺

El cociente CD4⁺/CD8⁺ no se pudo analizar en todos los gatos incluidos en el estudio por el estado en el que se recibieron las muestras de algunos animales (Figura 4.2.9.; Tabla 4.2.30. y 4.2.31.).

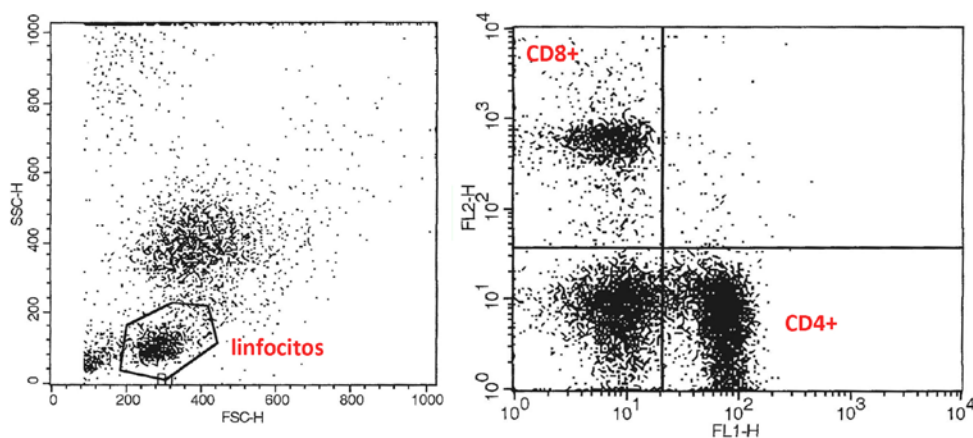


Figura 4.2.9. Poblaciones celulares CD4⁺ y CD8⁺ de los gatos FeLV⁺ y FIV⁺. Citograma representativo de un gato no infectado.

Tabla 4.2.30. Resultados del cociente $CD4^+/CD8^+$ en los gatos $FeLV^+$ en la V0 del estudio de Roferon®.

G.C.	Código	$CD4^+/CD8^+$	G.C.	Código	$CD4^+/CD8^+$	G.C.	Código	$CD4^+/CD8^+$
1	FeLV-03	↓	2	FeLV-02	n	3	FeLV-01	↓
	FeLV-07	n		FeLV-04	n		FeLV-06	s/d
	FeLV-09	↓		FeLV-05	n		FeLV-10	↓
	FeLV-13	n		FeLV-08	n		FeLV-11	n
	FeLV-16	n		FeLV-14	n		FeLV-12	s/d
	FeLV-17	n		FeLV-15	↓		FeLV-20	n
	FeLV-18	n		FeLV-19	s/d		FeLV-23	n
	FeLV-21	n		FeLV-24	n		FeLV-25	↓
	FeLV-22	n						
	FeLV-26	s/d						
	FeLV-27	n						

- $CD4^+/CD8^+$: n, $\geq 0,9$; ↓, $< 0,9$; s/d, sin determinar.

Tabla 4.2.31. Resultados del cociente $CD4^+/CD8^+$ en los gatos FIV^+ en la V0 del estudio de Roferon®.

G.C.	Código	$CD4^+/CD8^+$	G.C.	Código	$CD4^+/CD8^+$	G.C.	Código	$CD4^+/CD8^+$
1	FIV-01	↓	2	FIV-02	s/d	3	FIV-07	↓
	FIV-05	n		FIV-03	↓		FIV-08	s/d
	FIV-11	↓		FIV-04	↓		FIV-14	↓
	FIV-12	s/d		FIV-06	↓		FIV-15	↓
	FIV-18	↓		FIV-09	n		FIV-19	n
	FIV-23	↓		FIV-10	↓		FIV-20	↓
	FIV-25	n		FIV-13	↓		FIV-21	↓
	FIV-28	n		FIV-16	↓		FIV-24	s/d
	FIV-31	n		FIV-17	n		FIV-26	n
				FIV-22	↓			
				FIV-27	s/d			
				FIV-29	↓			
				FIV-30	↓			

- $CD4^+/CD8^+$: n, $\geq 0,9$; ↓, $< 0,9$; s/d, sin determinar.

El cociente $CD4^+/CD8^+$ se observó alterado ($< 0,9$) en un 26,1% de los gatos $FeLV^+$, con una media de 1,66. En los gatos FIV^+ el porcentaje de gatos alterados fue significativamente mayor ($p < 0,01$) con un 69,2% y una media del 0,80 (Tabla 4.2.32.).

Tabla 4.2.32. Valor medio del cociente $CD4^+/CD8^+$ y porcentaje de gatos $FeLV^+$ y FIV^+ con alteración del mismo en la V0 del estudio de Roferon®.* Diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,01$) entre los valores de los gatos FIV^+ y $FeLV^+$.

Infección (n)	Media $CD4^+/CD8^+$	n (%) de gatos con $CD4^+/CD8^+$ disminuido
$FeLV^+$ (23)	1,66	6 (26,1)*
FIV^+ (26)	0,80	18 (69,2)*

Aunque las diferencias no fueron estadísticamente significativas, se observó que un porcentaje superior de gatos FeLV⁺ del Grupo 3 presentó una media menor del cociente CD4⁺/CD8⁺ que la de los Grupos 1 y 2. De igual modo, los gatos FIV⁺ con signos clínicos (Grupos 2 y 3) presentaron un porcentaje de alteración superior y una media menor que en el grupo sin signos clínicos (Grupo 1) (Tabla 4.2.33.).

Tabla 4.2.33. Valor medio del cociente CD4⁺/CD8⁺ y porcentaje de gatos FeLV⁺ y FIV⁺ de cada G.C. con alteración del mismo en la V0 del el estudio de Roferon®.

Infección	Presencia signos clínicos	G.C. (n)	Media CD4 ⁺ /CD8 ⁺	n (%) alteración
FeLV ⁺	Sin signos clínicos (10)	Grupo 1 (10)	1,91	2 (20,0)
	Con signos clínicos (13)	Grupo 2 (7)	1,69	1 (14,3)
		Grupo 3 (6)	1,22	3 (50,0)
FIV ⁺	Sin signos clínicos (8)	Grupo 1 (8)	0,92	4 (50,0)
	Con signos clínicos (18)	Grupo 2 (11)	0,76	9 (81,8)
		Grupo 3 (7)	0,75	5 (71,4)

No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre machos y hembras, ni entre gatos jóvenes y adultos para ambas infecciones.

4.2.4. Situación de la infección vírica de los gatos incluidos en el estudio.

4.2.4.1. Proteínas víricas p24 y p27

Como ya se ha expresado en Material y Métodos (Apartado 3.2.1.), el criterio de inclusión para los gatos FeLV⁺ fue un resultado positivo a la detección de la proteína p27, por la técnica serológica de Snap Combo Plus® (Idexx). Por ello, el resultado de todos los individuos incluidos en el estudio fue positivo a esta proteína. No se observaron diferencias significativas entre los grupos clínicos (Tabla 4.2.34). Por el contrario, en los gatos FIV⁺ el test utilizado como criterio de inclusión detectaba la presencia de anticuerpos frente a la proteína p24. Cuando se realizó posteriormente el análisis del suero de estos gatos para detectar esta proteína no se evidenció su presencia en ninguno de los casos.

Tabla 4.2.34. Valor medio de la concentración de proteína p27 (ng/ml) en los gatos FeLV⁺ durante la V0 en el estudio de Roferon®.

Infección	G.C. (n)	p27
FeLV ⁺	Grupo 1 (10)	0,60
	Grupo 2 (7)	0,46
	Grupo 3 (6)	0,49

4.2.4.2. Actividad retrotranscriptasa (RT)

El número de partículas víricas infectivas se midió indirectamente a través de la actividad RT en el plasma de todos los gatos FeLV⁺ y FIV⁺. En el 71% de las muestras de los gatos FeLV⁺ se evidenció esta actividad enzimática de la RT (Tabla 4.2.35.). Sin embargo no se observaron resultados positivos en las muestras de los gatos FIV⁺.

En los gatos FeLV⁺ se hallaron diferencias estadísticamente significativas ($p<0,05$) entre los Grupos Clínicos establecidos, ya que la actividad RT se detectó en el 45% de los gatos del Grupo 1, en el 62,5% del Grupo 2 y en el 100% de los gatos del Grupo 3 (Tabla 4.2.35.).

Tabla 4.2.35. Resultados de la actividad RT en los gatos FeLV⁺ durante la V0 en el estudio de Roferon®.

Código	Grupo	RT	Código	Grupo	RT	Código	Grupo	RT
FeLV-03	1	+	FeLV-02	2	+	FeLV-01	3	+
FeLV-07	1	+	FeLV-04	2	+	FeLV-06	3	+
FeLV-09	1	+	FeLV-05	2	+	FeLV-10	3	+
FeLV-13	1	-	FeLV-08	2	-	FeLV-11	3	+
FeLV-16	1	-	FeLV-14	2	-	FeLV-12	3	+
FeLV-17	1	-	FeLV-15	2	+	FeLV-20	3	+
FeLV-18	1	-	FeLV-19	2	+	FeLV-23	3	+
FeLV-21	1	+	FeLV-24	2	-	FeLV-25	3	+
FeLV-22	1	-						
FeLV-26	1	+						
FeLV-27	1	-						

Además, en los gatos FeLV⁺ se observaron diferencias casi estadísticamente significativas ($p<0,1$) entre ambos sexos: los machos presentaron un porcentaje de positividad mayor que las hembras (81,8% y 56,25%, respectivamente). En este caso no se observó diferencia en la actividad RT entre ambos estados reproductivos o entre los dos grupos de edad.

4.2.4.3. Carga provírica

Se confirmó el resultado positivo del ELISA frente a la proteína p27 de FeLV y frente a los anticuerpos anti-p24 de FIV mediante PCR anidada y qPCR (apartados 3.2.14. y 3.2.16.). En todos los casos se obtuvo un resultado positivo. Debido a que no se disponía de un ADN de referencia para cuantificar la carga provírica se expresó en relación al gen de expresión estable GAPDH. El resultado obtenido de esta comparación fue utilizado para determinar la evolución de la carga provírica tras el tratamiento con Roferon®. No se observaron diferencias significativas entre los grupos clínicos en ambas infecciones (Tablas 4.2.36).

Tabla 4.2.36. Valor medio del cociente FeLV/GAPDH de los gatos FeLV⁺ y del cociente FIV/GAPDH de los gatos FIV⁺ en la V0 del estudio de Roferon®.

Infección	G.C. (n)	Media FeLV/GAPDH	Media FIV/GAPDH
FeLV ⁺	Grupo 1 (10)	0,718	
	Grupo 2 (7)	0,607	
	Grupo 3 (6)	0,706	
FIV ⁺	Grupo 1 (8)		0,822
	Grupo 2 (11)		0,810
	Grupo 3 (7)		0,848

4.2.4.4. Correlaciones entre los parámetros víricos y los demás parámetros estudiados

En los gatos FeLV⁺ se observó que la carga vírica presentaba una correlación positiva moderada estadísticamente significativa ($p < 0,05$) en relación a la concentración de proteína p27 ($R = 0,47$) y a la actividad RT ($R = 0,41$), y negativa respecto al cociente $CD4^+/CD8^+$ ($R = -0,42$) (Figura 4.2.10.).

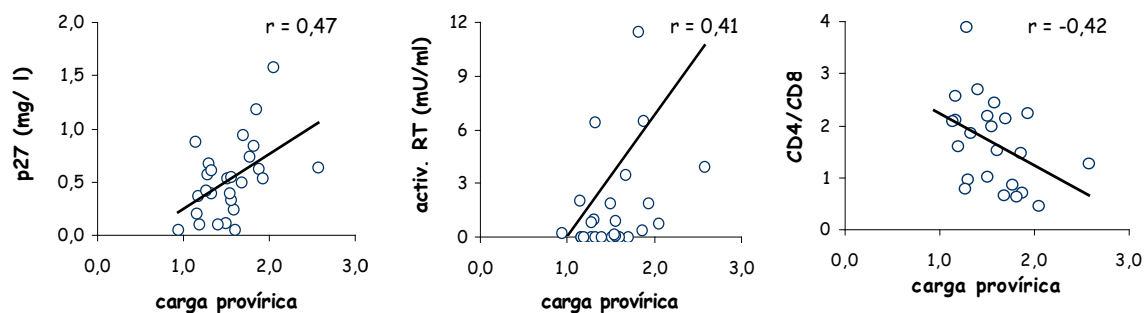


Figura 4.2.10. Correlación entre la carga provírica y la concentración de p27, la actividad RT y el cociente $CD4^+/CD8^+$ de los gatos FeLV⁺ en la V0 en el estudio de Roferon®.

En los gatos FeLV⁺ no se observó correlación entre la actividad RT y el recuento total de leucocitos, neutrófilos o linfocitos.

En los gatos FIV⁺ no se observó correlación entre la carga provírica y el cociente $CD4^+/CD8^+$. Como los análisis de la proteína p24 y la actividad RT fueron negativos no se pudieron establecer asociaciones entre ellos.

4.3. Seguimiento y evolución de la respuesta al tratamiento de los gatos tratados con Roferon®.

Se informó sobre el tratamiento a los propietarios de los gatos que cumplían con los criterios de inclusión, de modo que si aceptaban incluir a sus gatos en el estudio debían firmar el preceptivo consentimiento.

A los gatos incluidos en el estudio se les administró Roferon® siguiendo el protocolo descrito en el apartado 3.2.4. Se realizó una evaluación clínica y analítica de los gatos antes de iniciar el tratamiento (V0), y posteriormente se estableció un calendario de visitas que incluyó: una visita en el mes 2, mitad del tratamiento (V1), una segunda en el mes 4 o final del tratamiento (V2) y una última, cuatro a ocho meses después del final del tratamiento (V3).

Debido a diferentes circunstancias muchos propietarios no acudieron a todas las visitas. Por ello, el análisis de cada una de las visitas se ha realizado con respecto a los gatos que sí acudieron y no sobre el total de la población. El análisis se ha realizado mediante la comparación de cada una de las visitas (V1, V2 y V3) con la situación inicial (V0).

4.3.1. Seguimiento de la exploración y valoración clínica de la población incluida en el ensayo con Roferon®

El porcentaje de mortalidad de gatos a lo largo de todo el estudio fue del 7,4% en los gatos FeLV⁺ (dos gatos; FeLV-01 y -10) y del 3,2 % en los FIV⁺ (un gato; FIV-14); en los tres casos los gatos pertenecían al Grupo 3 y tenían una P.C. ≥ 7 en la V0 (Tablas 4.2.5. y 4.2.6.). Los gatos FeLV⁺ que murieron durante el estudio lo hicieron entre la V1 y la V2; sin embargo, el gato FIV-14 presentó una evolución favorable (disminución de la P.C.) entre la V0 y la V2 pero murió entre la V2 y la V3 (Tablas 4.3.1. y 4.3.2.).

En ningún caso, los gatos con P.C. igual a cero en la V0 manifestaron signos clínicos durante y después del tratamiento. Además, de los que presentaron signos clínicos en la V0, solamente dos gatos (FeLV-02 y FIV-22) mostraron un aumento de la P.C. con respecto a la situación inicial (Tablas 4.3.1. y 4.3.2.).

Tabla 4.3.1. Puntuación clínica y evolución con respecto a V0 de los gatos FeLV⁺ en las diferentes visitas del estudio con Roferon®.

G.C.	Código	V0	V1	V2	V3
1	FeLV-03	0	0	0	
	FeLV-07	0	0	0	0
	FeLV-09	0	0	0	0
	FeLV-13	0	0	0	
	FeLV-16	0	0	0	
	FeLV-17	0	0	0	0
	FeLV-18	0	0		0
	FeLV-21	0	0		
	FeLV-22	0	0	0	0
	FeLV-26	0			0
	FeLV-27	0	0	0	0
2	FeLV-02	4	7	5	
	FeLV-04	4	3	3	
	FeLV-05	4	4	2	

G.C.	Código	V0	V1	V2	V3
2 (cont.)	FeLV-08	4	4	2	
	FeLV-14	4	3	2	2
	FeLV-15	5	5	0	0
	FeLV-19	2	0	0	
	FeLV-24	1	0	0	
3	FeLV-01	5	5	3	1
	FeLV-06	8	8	muerte	
	FeLV-10	8	2	2	
	FeLV-11	7	7	muerte	
	FeLV-12	7	5	4	
	FeLV-20	13	13	8	
	FeLV-23	6	2	0	0
	FeLV-25	7	7	0	0

Código de colores (variación de la P.C. con respecto a la V0): “verde”, disminución; “naranja”, estable siendo distinta de cero; “blanco”, estable en cero; “rojo”, aumento; “gris” sin determinar.

Tabla 4.3.2. Puntuación clínica y evolución con respecto a V0 de los gatos FIV⁺ en las diferentes visitas del estudio con Roferon®.

G.C.	Código	V0	V1	V2	V3
1	FIV-01	0	0	0	0
	FIV-05	0	0		0
	FIV-11	0	0	0	0
	FIV-12	0		0	0
	FIV-18	0		0	0
	FIV-23	0	0		0
	FIV-25	0		0	0
	FIV-28	0	0	0	0
	FIV-31	0	0	0	
	FIV-02	4	0	0	0
2	FIV-03	3	0		0
	FIV-04	3	1	0	
	FIV-06	5	0	0	0
	FIV-09	2		0	0
	FIV-10	4	2	0	0
	FIV-13	5	1		0
G.C.	Código	V0	V1	V2	V3
2 (cont.)	FIV-16	2	2		
	FIV-17	4	2	0	0
	FIV-22	3	4	2	8
	FIV-27	4	3	2	0
	FIV-29	2	0		0
	FIV-30	2		0	2
	FIV-07	6	3	3	1
	FIV-08	7	2	2	2
	FIV-14	9		4	muerte
	FIV-15	7	5	4	
3	FIV-19	6	5	0	0
	FIV-20	6	1	1	0
	FIV-21	6	2	2	
	FIV-24	6	6	0	0
	FIV-26	7	3	0	

Código de colores (variación de la P.C. con respecto a la V0): “verde”, disminución; “naranja”, estable siendo distinta de cero; “blanco”, estable en cero; “rojo”, aumento; “gris” sin determinar.

Los resultados mostraron que en ambas infecciones se produjo una mejoría clínica de la enfermedad con respecto a la situación inicial. El mayor porcentaje de gatos FeLV⁺ que mejoraron su puntuación clínica con respecto a V0 se produjo durante la V3 (Tabla 4.3.3.). Además, fue en esta visita donde se redujo en mayor porcentaje la puntuación clínica media (92,7%; Tabla 4.3.3.). Por otro lado, en los gatos FIV⁺ el mayor porcentaje de gatos con mejoría en su puntuación clínica y de reducción de la puntuación clínica media se produjo durante la V2, 100% y 76,9%, respectivamente (Tabla 4.3.3.; Tabla 4.3.4.).

Durante la V1 solamente el 46,6% de los gatos FeLV⁺ presentaron una evolución favorable, mientras que en los gatos FIV⁺ este porcentaje se incrementó hasta el 84,2% (Tabla 4.3.3.). En ambas infecciones hubo un gato con una evolución desfavorable (FeLV-02 y FIV-22) (Tablas 4.3.1 y 4.3.2.).

Tabla 4.3.3. Porcentaje de gatos FeLV⁺ y FIV⁺ con evolución favorable, estable y desfavorable de la puntuación clínica con respecto a V0 incluidos en el estudio con Roferon®.

Infección	Evolución	V1 n (%)	V2 n (%)	V3 n (%)
FeLV ⁺	favorable	7 (46,6)	13 (81,3)	5 (100)
	estable	7 (46,6)	0	0
	desfavorable	1 (6,6)	3 (18,7)	0
FIV ⁺	favorable	16 (84,2)	18 (100)	14 (87,5)
	estable	2 (10,5)	0	1 (6,2)
	desfavorable	1 (5,3)	0	1 (6,2)

Se considera evolución favorable cuando la P.C. disminuye con respecto a la situación inicial (V0), desfavorable cuando aumenta, estable cuando se mantiene en un valor distinto a cero.

Si se considera el valor medio de la P.C., hubo una disminución paulatina de la misma con el tratamiento. En el caso de los gatos FeLV⁺ se produjo una reducción de la P.C. de forma gradual a lo largo de las visitas, mientras que en los gatos FIV⁺ se produjo un descenso más acusado durante la V1 y la V2, pero se mantuvo posteriormente. Aunque se partía de una situación muy similar en la V0, en la V3 la P.C. media de los gatos FIV⁺ fue el triple de la de los FeLV⁺ (Figura 4.3.1.; Tabla 4.3.4.). Una evolución similar se observó en la P.C. de los gatos que presentaban signos clínicos en cada una de las visitas (Tabla 4.3.5.).

A tenor de estos resultados, se podría señalar que en el caso de los gatos FeLV⁺ la respuesta al Roferon® fue más lenta que en los gatos FIV⁺, aunque fue más persistente al no observarse signos clínicos cuatro-ocho meses después de finalizar la administración del tratamiento.

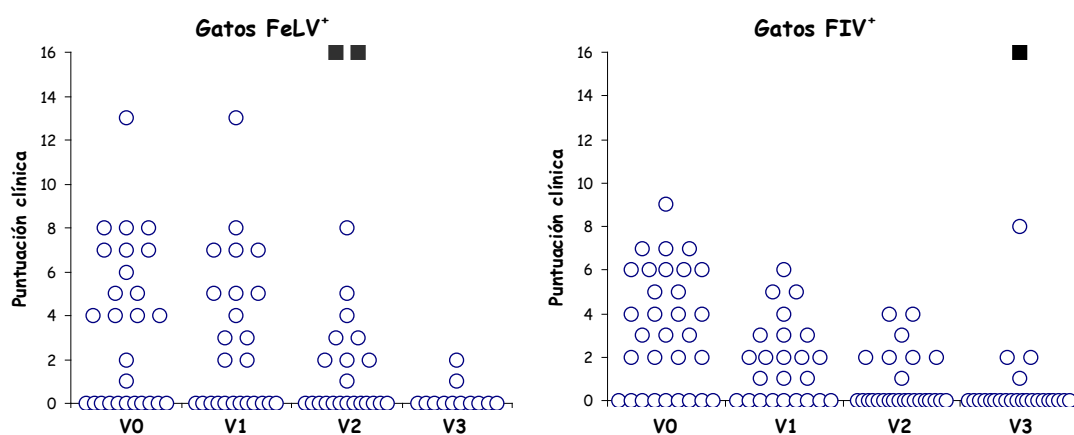


Figura 4.3.1. P.C. de los gatos durante el estudio. Cada uno de los círculos representa un gato analizado, y cada cuadrado negro representa un gato muerto.

Tabla 4.3.4. Valor medio de la P.C. total y porcentaje de reducción con respecto a la V0 de todos los gatos FeLV⁺ y FIV⁺ incluidos en el estudio con Roferon®.

Infección	Valor medio de la P.C. y porcentaje de reducción			
	V0 Media	V1 Media (%)	V2 Media (%)	V3 Media (%)
FeLV ⁺	3,44	2,84 (17,5)	1,41 (59,1)	0,25 (92,7)
FIV ⁺	3,32	1,75 (47,3)	0,77 (76,9)	0,83 (74,9)

Tabla 4.3.5. P.C. media y porcentaje de reducción con respecto a la V0 de los gatos FeLV⁺ y FIV⁺ con signos clínicos incluidos en el estudio con Roferon®.

Infección	Puntuación clínica media			
	V0	V1	V2	V3
FeLV ⁺	5,81	5,46 (6,0)	3,44 (40,7)	1,50 (74,2)
FIV ⁺	4,68	2,80 (40,2)	2,50 (46,6)	2,50 (46,6)

Por último, si se estudian los diferentes signos clínicos se aprecia que en todos los casos se produjo un descenso de éstos en las diferentes visitas. Aquellos signos clínicos que se presentaron con más frecuencia (disorexia, astenia, deterioro de la condición corporal, lesiones orales o alteraciones respiratorias) se redujeron gradualmente en las diferentes visitas hasta porcentajes muy bajos o incluso llegando a no

describirse en ningún gato. Sin embargo, la linfadenomegalia y las lesiones orales de los gatos FeLV⁺ fueron los signos clínicos más persistentes a lo largo del estudio, ya que aunque disminuyeron, su porcentaje de reducción fue inferior al de otros signos clínicos durante la V2. En el caso de los gatos FeLV⁺ solamente se observaron dos signos clínicos en la V3 (linfadenomegalia y alteraciones digestivas), mientras que en los gatos FIV⁺ se observaron hasta ocho signos clínicos diferentes (disorexia, astenia, deterioro de la condición corporal, palidez de mucosas, conjuntivitis, lesiones orales, alteraciones digestivas y alteraciones respiratorias) (Tabla 4.3.6.).

Tabla 4.3.6. Porcentaje de aparición de cada uno de los signos clínicos en los gatos FeLV⁺ y FIV⁺ incluidos en el estudio con Roferon®.

Infección	Visita (nº gatos)	Alt. del apetito	Astenia	Deter. condición corporal	Linfadenomegalia	Alt. de las mucosas	Conjuntivitis	Lesiones orales	Alt. digestivas	Lesiones cutáneas	Alt. respiratorias
FeLV	V0 (n=27)	33,3	33,3	18,5	18,5	25,9	25,9	29,6	11,1	11,1	29,6
	V1 (n=25)	32,0	28,0	4,0	16,0	12,0	24,0	28,0	4,0	8,0	24,0
	V2 (n=24)	13,6	9,1	4,5	13,6	4,5	13,6	22,7	0,0	0,0	9,1
	V3 (n=12)	0,0	0,0	0,0	8,3	0,0	0,0	0,0	8,3	0,0	0,0
FIV	V0 (n=31)	54,8	41,9	19,4	19,4	29,0	16,1	32,3	9,7	12,9	22,6
	V1 (n=25)	25,0	29,2	8,3	12,5	4,2	12,5	20,8	8,3	4,2	4,2
	V2 (n=25)	11,5	15,4	0,0	7,7	0,0	7,7	3,8	0,0	3,8	7,7
	V3 (n=24)	4,2	4,2	4,2	0,0	4,2	4,2	4,2	4,2	0,0	8,3

No se observaron diferencias significativas en la evolución de los signos clínicos entre los grupos clínicos. Tampoco se observaron diferencias en la evolución entre ambos sexos y grupos de edad.

4.3.2. Seguimiento de la analítica sanguínea de la población incluida en el ensayo con Roferon®

4.3.2.1. Hemograma

De forma general, se observó que la respuesta al tratamiento de los tres valores hematológicos estudiados estuvo muy ligada, sobre todo, el hematocrito y la concentración de hemoglobina que tuvieron en la mayoría de los gatos una evolución paralela (Tablas 4.3.7. y 4.3.8.). Sin embargo, en el caso del recuento de eritrocitos, en algunos gatos (FIV-20, -24, -25 y -27) los valores de hematocrito y de concentración de hemoglobina estaban alterados, mientras el recuento eritrocitario permaneció dentro de los límites de normalidad (Tabla 4.3.8.).

Tabla 4.3.7. Resultado y evolución con respecto a la V0 del hemograma de los gatos FeLV⁺ incluidos en el estudio con Roferon®. Htc., hematocrito; Hgb., concentración de hemoglobina; Eritro., recuento de eritrocitos; s/d, sin determinar; G.C., Grupo clínico.

G.C.	Código	Visita	Htc.	Hgb.	Eritro.
1	FeLV-03	1	n-n	n-n	n-n
		2	n-n	n-n	n-n
	FeLV-07	1	s/d	s/d	s/d
		2	↓-↓-↓	↓-↓	n-n
		3	↓-↓-↓	↓-↓	s/d
	FeLV-09	1	↓-↓	↓-↓	↓-↓
		2	↓-↓	↓-↓	↓-↓
		3	↓-↓	↓-↓	↓-↓
	FeLV-13	1	n-n	n-n	n-n
		2	n-n	n-n	n-n
	FeLV-16	1	n-n	n-n	n-n
		2	n-n	n-n	n-n
	FeLV-17	1	n-n	n-n	n-n
		2	s/d	s/d	s/d
		3	n-n	n-n	n-n
	FeLV-18	1	n-n	n-n	n-n
		3	n-↓	n-↓	n-↓
	FeLV-21	1	↓-↓	n-n	n-n
	FeLV-22	1	n-n	n-n	n-n
		2	n-n	n-n	n-n
		3	n-n	n-n	n-n
	FeLV-26	3	n-↓	n-↓	s/d
	FeLV-27	1	↓-↓	↓-↓	n-n
		2	↓-↓	↓-↓	n-n
		3	↓-↓	↓-↓	n-n
2	FeLV-02	1	n-n	n-n	n-n
		2	n-n	n-n	n-n
	FeLV-04	1	s/d	s/d	s/d
		2	n-n	n-n	n-n
	FeLV-05	1	n-n	n-n	n-n
		2	n-n	n-n	n-n
2 (cont.)	FeLV-08	1	n-n	n-n	s/d
		2	n-n	n-n	n-n
		3	n-↓	n-↓	n-↓
	FeLV-14	1	n-n	n-n	s/d
		2	n-n	n-n	n-n
		3	n-↓	n-↓	s/d
	FeLV-15	1	↓-↓-↓	↓-↓	↓-↓
		2	↓-↓-↓	↓-↓	↓-↓
	FeLV-19	1	n-n	n-n	s/d
		2	n-n	n-n	n-n
	FeLV-24	1	↓-↓-↓	↓-↓	↓-↓
		2	↓-↓-↓	↓-↓	↓-↓
		3	↓-↓-↓	↓-↓	↓-↓
	FeLV-01	1	↓-↓-↓	↓-↓	↓-↓
		2	muerte		
	FeLV-06	1	n-n	n-n	n-n
		2	n-n	n-n	n-n
	FeLV-10	1	↓-↓-↓	↓-↓	↓-↓
		2	muerte		
	FeLV-11	1	n-n	n-n	n-n
		2	n-n	n-n	n-n
	FeLV-12	1	n-n	n-n	n-n
		2	n-n	n-n	n-n
	FeLV-20	1	↓-↓	↓-↓	↓-↓
		2	↓-↓	↓-↓	↓-↓
		3	↓-↓	↓-↓	↓-↓
	FeLV-23	1	n-n	n-n	n-n
		2	n-n	n-n	n-n
		3	n-n	n-n	n-n
	FeLV-25	2	n-n	n-n	s/d

- Htc.: n, ≥26%; ↓, <26% y ≥20%; ↓↓, <20% y ≥14%; ↓↓↓, <14 %.
- Hgb.: n, ≥15g/dl; ↓, <15g/dl
- Eritro.: n, ≥5x10⁶ eritrocitos/μl; ↓, <5x10⁶ eritrocitos/μl
- Los resultados se representan con dos símbolos, el primero indica la situación inicial (V0) y el segundo la situación el día de la visita correspondiente.
- Código de colores (variación con respecto a la V0): “blanco”, mantenimiento la normalidad; “verde”, evolución favorable; “amarillo”, persistencia de la alteración; “rojo”, evolución desfavorable; “gris”, sin determinar.

Tabla 4.3.8. Resultado y evolución con respecto a la V0 del hemograma de los gatos FIV⁺ incluidos en el estudio con Roferon®. Htc., hematocrito; Hgb., concentración de hemoglobina; Eritro., recuento de eritrocitos; s/d, sin determinar; G.C., Grupo clínico.

G.C.	Código	Visita	Htc.	Hgb.	Eritro.
1	FIV-01	1	n-n	n-n	n-n
		2	n-n	n-n	n-n
		3	n-n	n-n	n-n
	FIV-05	1	n-n	n-n	n-n
		3	n-n	n-n	n-n
	FIV-11	1	↓-n	n-n	n-n
		2	↓-n	n-n	n-n
		3	↓-n	n-n	n-n
	FIV-12	2	s/d	s/d	s/d
		3	n-n	n-n	n-n
	FIV-18	2	↓-n	↓-n	↓-n
		3	↓-n	↓-n	↓-n
	FIV-23	1	s/d	s/d	s/d
		3	n-n	n-n	n-n
	FIV-25	2	n-n	n-n	n-n
		3	n-↓	n-↓	n-n
	FIV-28	1	n-n	n-n	n-n
		2	n-n	n-n	n-n
		3	n-n	n-n	n-n
	FIV-31	1	↓-n	↓-n	s/d
		2	↓-n	↓-n	n-n
2	FIV-02	1	n-n	n-n	n-n
		2	n-n	n-n	n-n
		3	n-n	n-n	n-n
	FIV-03	2	n-n	n-n	n-n
		3	n-n	n-n	n-n
	FIV-04	1	n-↓↓	n-↓	n-↓
		2	n-n	n-n	n-n
	FIV-06	1	n-n	n-n	s/d
		2	n-↓	n-↓	n-↓
		3	n-n	n-n	n-n
	FIV-09	2	↓↓-n	↓-n	↓-n
		3	↓↓-n	↓-n	↓-n
	FIV-10	1	n-n	n-n	n-n
		2	s/d	s/d	s/d
		3	n-n	n-n	n-n
	FIV-13	1	↓↓-n	↓-n	↓-n
		3	↓↓-n	↓-n	↓-n
2 (cont.)	FIV-16	1	n-n	n-n	n-n
	FIV-17	1	n-n	s/d	s/d
		2	n-n	n-n	n-n
	FIV-22	3	n-n	n-n	n-n
		1	n-n	n-n	n-n
		2	s/d	s/d	s/d
	FIV-27	3	n-n	n-n	n-n
		1	n-↓	n-↓	n-n
		2	n-n	n-n	n-n
	FIV-29	3	n-n	n-n	n-n
		1	↓-n	↓-n	↓-n
	FIV-30	3	↓-↓	↓-n	↓-n
		2	↓-↓	↓-↓	n-n
		3	↓-n	↓-n	n-n
3	FIV-07	1	n-n	n-n	s/d
		2	s/d	s/d	s/d
		3	n-n	n-n	n-n
	FIV-08	1	↓-n	↓-n	n-n
		2	↓-n	↓-n	n-n
		3	↓-n	↓-n	n-n
	FIV-14	2	n-n	n-n	n-n
		3	muerte		
	FIV-15	1	↓-n	↓-n	↓-n
		2	↓-n	↓-n	↓-n
	FIV-19	1	↓-↓	↓-↓	n-n
		2	↓-n	↓-n	n-n
		3	↓-n	↓-n	n-n
	FIV-20	1	n-↓	n-↓	s/d
		2	n-↓	n-n	n-n
		3	n-n	n-n	n-n
	FIV-21	1	↓-n	↓-n	↓-n
		2	↓-n	↓-n	↓-n
	FIV-24	1	n-n	n-n	n-n
		2	n-n	n-n	n-n
		3	n-↓	n-↓	n-n
	FIV-26	1	n-n	n-n	n-n
		2	n-n	n-n	n-n

- Htc.: n, ≥26%; ↓, <26% y ≥20%; ↓↓, <20% y ≥14%; ↓↓↓, <14 %.
- Hgb.: n, ≥15g/dl; ↓, <15g/dl
- Eritro.: n, ≥5x10⁶ eritrocitos/μl; ↓, <5x10⁶ eritrocitos/μl
- Los resultados se representan con dos símbolos, el primero indica la situación inicial (V0) y el segundo la situación el día de la visita correspondiente.
- Código de colores (variación con respecto a la V0): “blanco”, mantenimiento la normalidad; “verde”, evolución favorable; “amarillo”, persistencia de la alteración; “rojo”, evolución desfavorable; “gris”, sin determinar.

El porcentaje de gatos con valores del hemograma alterados disminuyó en ambas infecciones (Figura 4.3.2.). En los gatos FeLV⁺ la mayor recuperación se observó al finalizar la administración del tratamiento (V2), estando los valores del hemograma en la mayoría de los gatos dentro del rango de normalidad. No obstante,

posteriormente aumentó el porcentaje de gatos anémicos, lo que hemos denominado “efecto rebote”. En cambio, en los gatos FIV⁺ se observó una disminución constante del porcentaje de gatos anémicos, siendo durante la V3 cuando se observó una mayor recuperación. Las diferencias entre ambas infecciones fueron casi significativas durante la V2 ($p<0,1$) y significativas durante la V3 ($p<0,05$).

Cuatro gatos FeLV⁺ sin alteraciones en el hemograma durante la V0 las desarrollaron a lo largo del estudio (FeLV-08, -14, -18, -26), en los cuatro casos durante la V3 (Tabla 4.3.7.). En los gatos FIV⁺ esta evolución desfavorable se observó en seis gatos (FIV-04, -06, -20, -24, -25, -27), aunque en este caso se produjo durante las V1, V2 y V3 (Tabla 4.3.8.). Las alteraciones del hemograma observadas en la V0 se normalizaron en la V3 en todos los gatos excepto en los gatos FeLV-20 y -27 y FIV-29.

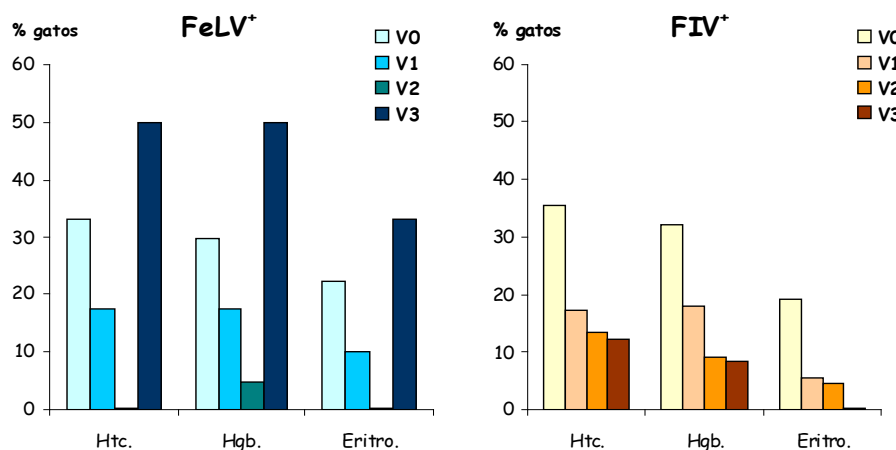


Figura 4.3.2. Porcentaje de los gatos FeLV⁺ y FIV⁺ incluidos en el estudio con Roferon[®] con alteración del hemograma. Htc., hematocrito; Hgb., concentración de hemoglobina; Eritro., recuento de eritrocitos.

La media de cada uno de los valores estudiados en el hemograma se incrementó durante el tratamiento con Roferon[®], tanto el valor total como la de los gatos que la presentaban alterada en cada una de las visitas (Tabla 4.3.9.). Sin embargo, en el caso de FeLV⁺ se observó un descenso de la media en los tres valores estudiados en la V3; este empeoramiento estaría asociado y confirmaría el “efecto rebote” señalado anteriormente.

El estudio general e independiente de cada una de las infecciones no mostró diferencias significativas en la evolución de los valores del hemograma estudiados entre sexos, edades y grupos clínicos.

Tabla 4.3.9. Media de los valores del hemograma del total de gatos infectados por FeLV⁺ y FIV⁺ y de aquellos que presentaban alguna alteración en cada visita incluidos en el estudio con Roferon[®]. Htc., hematocrito; Hgb., concentración de hemoglobina; Eritro., recuento de eritrocitos.

Infección	Visita	Htc.		Hgb.		Eritro.	
		Total	Alterados	Total	Alterados	Total	Alterados
FeLV ⁺	V0	31,88	18,33	10,57	5,74	7,59	4,04
	V1	33,55	21,25	10,48	6,38	7,53	5,20
	V2	36,27	-	11,69	7,50	8,80	-
	V3	29,08	22,50	9,17	6,80	6,45	4,26
FIV ⁺	V0	32,07	23,00	10,02	6,82	6,65	4,36
	V1	32,96	22,23	10,29	6,73	7,64	4,79
	V2	34,05	24,00	10,35	7,35	7,32	4,37
	V3	36,79	23,93	10,96	7,23	8,04	-

4.3.2.2. Formula leucocitaria

Se analizó la evolución del número de leucocitos y de las poblaciones celulares de neutrófilos y linfocitos de los gatos tratados con Roferon® (Tablas 4.3.10. y 4.3.11.)

Tabla 4.3.10. Resultado y evolución con respecto a la V0 de la formula leucocitaria de los gatos FeLV⁺ incluidos en el estudio con Roferon®. Leuc., número de leucocitos; Ntrf., número de neutrófilos; Linf., número de linfocitos; s/d, sin determinar; G.C., Grupo clínico.

G.C.	Código	Visita	Leuc.	Ntrf.	Linf.
1	FeLV-03	1	↓-↑	↓-↑	↓-n
		2	↓-n	↓-n	↓-n
	FeLV-07	1	s/d	s/d	s/d
		2	↓-n	↓-n	↓-n
	FeLV-09	1	↓-↑	n-↑	↓-n
		2	↓-n	n-n	↓-n
		3	↓-n	n-n	↓-n
	FeLV-13	1	n-n	n-n	n-n
		2	n-n	n-↓	n-n
	FeLV-16	1	↓-↑	↓-↑	↓-n
		2	↓-n	↓-↓	↓-n
	FeLV-17	1	n-↓	n-↓	n-n
		2	s/d	s/d	s/d
		3	n-n	n-n	n-n
	FeLV-18	1	n-↑	↓-↑	n-n
		3	n-n	↓-n	n-n
	FeLV-21	1	n-n	n-n	n-↓
	FeLV-22	1	n-n	n-↑	n-n
		2	n-n	n-n	n-n
		3	n-↓	n-↓	n-n
	FeLV-26	3	n-↓	↓-n	n-↓
	FeLV-27	1	n-n	n-n	n-n
		2	n-n	n-n	n-n
		3	n-n	n-n	n-n
2	FeLV-02	1	n-n	n-n	n-n
		2	n-n	n-n	n-n
	FeLV-04	1	s/d	s/d	s/d
		2	n-n	n-n	n-↑
	FeLV-05	1	n-↑	n-↑	n-n
		2	n-↓	n-↓	n-n
3	FeLV-08	1	n-n	n-n	n-n
		2	n-n	n-n	n-n
		3	n-n	n-↑	n-↓
	FeLV-14	1	↓-n	n-↓	n-n
		2	↓-n	n-n	n-n
		3	↓-↑	n-↑	n-n
	FeLV-15	1	n-n	↓-n	n-n
		2	n-n	↓-n	n-n
	FeLV-19	1	n-n	n-↓	n-n
		2	n-n	n-n	n-n
	FeLV-24	1	n-↑	n-↑	n-n
		2	n-n	n-↓	n-n
		3	n-n	n-↑	n-n
	FeLV-01	1	n-n	n-n	↓-↓
		2	muerte		
	FeLV-06	1	n-↑	n-↑	n-↑
		2	n-↑	n-↑	n-↑
	FeLV-10	1	n-↓	↓-↓	↑-↓
		2	muerte		
	FeLV-11	1	↓-↑	↓-↑	n-n
		2	↓-n	↓-n	n-n
	FeLV-12	1	n-↑	↓-↑	↑-n
		2	n-↑	↓-↑	↑-n
	FeLV-20	1	n-n	n-n	n-n
		2	n-n	n-n	n-↓
		3	n-↑	n-↑	n-↓
	FeLV-23	1	↓-↓	↓-↓	n-n
		2	↓-↓	↓-↓	n-n
		3	↓-↓	↓-n	n-n
	FeLV-25	2	n-n	n-n	n-n

- Leuc.: n, ≥ 5.500 y ≤ 19.500 Leuc./ μ l; ↓, < 5.500 Leuc./ μ l; ↑, > 19.500 Leuc./ μ l
- Ntrf.: n, ≥ 2.500 y ≤ 12.500 Ntrf./ μ l; ↓, < 2.500 Ntrf./ μ l; ↑, > 12.500 Ntrf./ μ l
- Linf.: n, ≥ 1.500 y ≤ 7.700 Linf./ μ l; ↓, < 1.500 Linf./ μ l; ↑, > 7.700 Linf./ μ l
- Los resultados se representan con dos símbolos, el primero indica la situación inicial (V0) y el segundo la situación el día de la visita correspondiente.
- Código de colores (variación con respecto a la V0): “rojo”, desarrollo o persistencia de una citopenia; “verde”, evolución favorable a partir de una citopenia; “amarillo”, desarrollo de una citosis partiendo de la normalidad; “anaranjado”, normalización partiendo de una citosis; “blanco”, se mantiene la normalidad; “gris”, sin determinar.

Tabla 4.3.11. Resultado y evolución con respecto a la V0 de la formula leucocitaria de los gatos FIV⁺ incluidos en el estudio con Roferon®. Leuc., número de leucocitos; Ntrf., número de neutrófilos; Linf., número de linfocitos; s/d, sin determinar; G.C., Grupo clínico.

G.C.	Código	Visita	Leuco	Ntrf	Linf
1	FIV-01	1	↓-↓	↓-↓	n-n
		2	↓-n	↓-n	n-n
		3	↓-n	↓-n	n-n
	FIV-05	1	↓-n	↓-n	n-n
		3	↓-n	↓-n	n-n
	FIV-11	1	n-n	↓-n	n-n
		2	n-n	↓-n	n-↑
		3	n-n	↓-n	n-↑
	FIV-12	2	s/d	s/d	s/d
		3	n-↓	n-↓	n-n
	FIV-18	2	↑-n	↑-n	↓-n
		3	↑-↑	↑-↑	↓-n
	FIV-23	1	s/d	s/d	s/d
		3	n-n	n-n	n-n
	FIV-25	2	n-n	n-n	n-n
		3	n-n	n-n	n-n
	FIV-28	1	n-n	n-n	n-n
		2	n-↑	n-n	n-↑
		3	n-n	n-n	n-n
	FIV-31	1	n-n	n-n	↓-n
		2	n-n	n-n	↓-n
2	FIV-02	1	n-n	n-n	n-↓
		2	n-n	n-n	n-n
		3	n-n	n-n	n-n
	FIV-03	2	n-n	n-n	n-↑
		3	n-n	n-n	n-n
	FIV-04	1	n-↓	n-↓	n-↓
		2	n-↓	n-↓	n-n
	FIV-06	1	↑-↑	↑-n	n-n
		2	↑-n	↑-n	n-n
		3	↑-n	↑-n	n-n
	FIV-09	2	↓-n	↓-n	n-↑
		3	↓-n	↓-n	n-↑
	FIV-10	1	n-n	n-n	n-n
		2	s/d	s/d	s/d
		3	n-n	n-n	n-n
	FIV-13	1	n-↓	↑-↓	↓-n
		3	n-n	↑-n	↓-n
G.C.	Visita	Visita	Leuco	Ntrf	Linf
2 (cont.)	FIV-16	1	n-n	n-n	↓-n
		1	n-n	n-n	n-n
	FIV-17	2	n-n	n-n	n-n
		3	n-n	n-↓	n-n
	FIV-22	1	↓-n	↓-n	n-↓
		2	s/d	s/d	s/d
		3	↓-↓	↓-↓	n-n
	FIV-27	1	n-n	↑-n	n-n
		2	n-↑	↑-↑	n-n
		3	n-n	↑-n	n-n
	FIV-29	1	n-n	↓-n	n-n
		3	n-n	s/d	s/d
	FIV-30	2	n-n	n-↑	n-n
		3	n-n	n-n	n-↑
3	FIV-07	1	n-↑	n-↑	n-n
		2	s/d	s/d	s/d
		3	n-n	n-↓	n-n
	FIV-08	1	↑-n	↑-n	n-n
		2	↑-n	↑-n	n-n
		3	↑-n	↑-↓	n-n
	FIV-14	2	n-n	↓-↑	n-n
		3	muerte		
	FIV-15	1	n-n	↓-n	n-n
		2	n-n	↓-n	n-↓
	FIV-19	1	↓-n	n-n	↓-n
		2	↓-n	n-n	↓-n
		3	↓-n	n-n	↓-n
	FIV-20	1	n-n	↓-n	n-n
		2	n-n	↓-n	n-n
		3	n-n	↓-n	n-↓
	FIV-21	1	↑-n	↑-n	↑-n
		2	↑-n	↑-n	↑-n
	FIV-24	1	↓-n	↓-↓	↓-n
		2	↓-n	↓-n	↓-↑
		3	↓-↑	↓-↑	↓-n
	FIV-26	1	↓-↑	n-n	n-↑
		2	↓-↑	n-n	n-↑

- Leuc.: n, ≥5.500 y ≤19.500 Leuc./μl; ↓, <5.500 Leuc./μl; ↑, >19.500 Leuc./μl
- Ntrf.: n, ≥2.500 y ≤12.500 Ntrf./μl; ↓, <2.500 Ntrf./μl; ↑, >12.500 Ntrf./μl
- Linf.: n, ≥1.500 y ≤7.700 Linf./μl; ↓, <1.500 Linf./μl; ↑, >7.700 Linf./μl
- Los resultados se representan con dos dígitos, el primero indica la situación inicial y el segundo la situación el día de esa Visita.
- Código de colores (variación con respecto a la V0): "rojo", desarrollo o persistencia de una citopenia; "verde", evolución favorable a partir de una citopenia; "amarillo", desarrollo de una citosis partiendo de la normalidad; "anaranjado", normalización partiendo de una citosis; "blanco", se mantiene la normalidad; "gris", sin determinar.

En los gatos FeLV⁺ se observó una disminución de los porcentajes de leucopenia, linfopenia y neutropenia durante la V1. Durante la V2, el porcentaje de gatos con leucopenia disminuyó hasta un 9,5% y con linfopenia hasta un 4,8% de los animales, manteniéndose un mayor porcentaje de gatos con neutropenia (23,8%). Sin embargo, durante la V3 se produjo el proceso inverso, ya que los porcentajes de linfopenia y leucopenia aumentaron hasta un 25%, mientras que la neutropenia se redujo al 8,3% de los gatos (Figura 4.3.3.; Tabla 4.3.12.).

Otro hecho destacable en los gatos FeLV⁺ fue el aumento del porcentaje de neutrofilia en las visitas 1 y 3, como consecuencia de ello, el aumento de la leucocitosis. Durante la V2 el porcentaje de neutrofilia y leucocitosis también estuvieron aumentados con respecto a la V0, pero en menor proporción que en las otras visitas (Figura 4.3.3.; Tabla 4.3.12.).

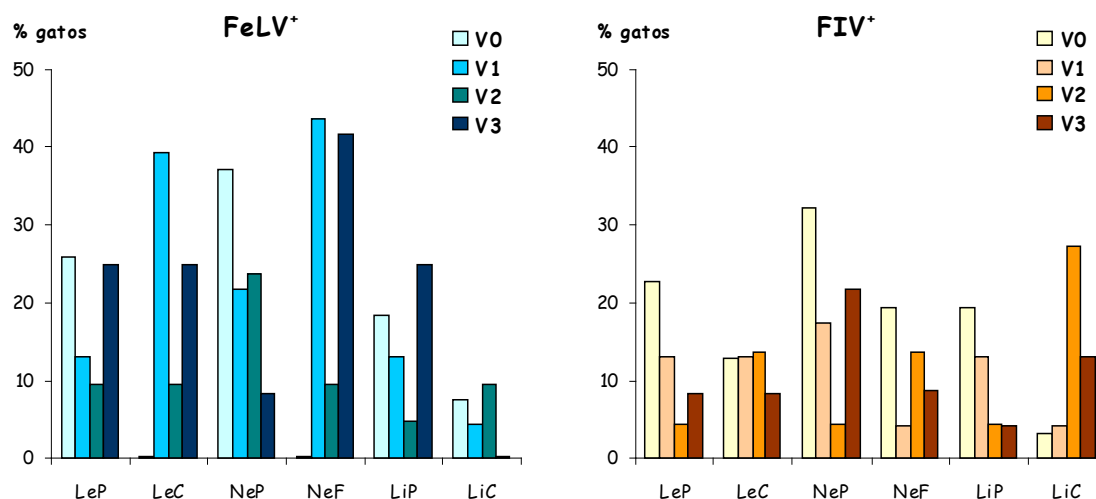


Figura 4.3.3. Porcentaje de alteración de la fórmula leucocitaria de los gatos FeLV⁺ y FIV⁺ incluidos en el estudio con Roferon®. Alteraciones: LeP, leucopenia; LeC, leucocitosis; NeP, neutropenia; NeF, neutrofilia; LiP, linfopenia; LiC, linfocitosis.

La evolución de la serie blanca en el grupo de gatos FIV⁺ tratados con Roferon® se caracterizó por una disminución del porcentaje de gatos con leucopenia, neutropenia y linfopenia, produciéndose un aumento de la neutropenia y la leucopenia durante la V3. Al contrario de lo ocurrido con los gatos FeLV⁺, en los FIV⁺ se redujo el porcentaje de gatos con neutrofilia durante la V1 y hubo un aumento de linfocitosis y neutrofilia durante la V2 (Figura 4.3.3.; Tabla 4.3.12.).

Tabla 4.3.12. Porcentaje de alteración de la fórmula leucocitaria de los gatos FeLV⁺ y FIV⁺ incluidos en el estudio con Roferon®.

	FeLV ⁺ (%)				FIV ⁺ (%)			
	VO	V1	V2	V3	VO	V1	V2	V3
Leucocitosis	0	39,1	9,5	25,0	12,9	13,0	13,6	8,3
Leucopenia	25,9	13,0	9,5	25,0	22,6	13,0	4,5	8,3
Neutrofilia	0	43,5	23,8	41,7	19,4	4,3	13,6	8,7
Neutropenia	37,0	21,7	28,6	8,3	32,3	17,4	4,5	21,7
Linfocitosis	7,4	4,3	9,5	0	3,2	4,3	27,3	13,0
Linfopenia	18,5	13,0	4,8	25,0	19,4	13,0	4,5	4,3

De forma general, los valores medios del recuento total leucocitario, de neutrófilos y de linfocitos aumentaron en los gatos que presentaban procesos citopénicos. Es decir, con el tratamiento con Roferon® no sólo disminuyó el porcentaje de gatos con citopenias sino que también se redujo el grado de alteración de las mismas en los gatos que las tenían. Excepcionalmente, se observó una reducción de la media de la linfopenia de los gatos FeLV⁺ y una disminución de la media de los recuentos de neutrófilos en la V3 de los gatos FIV⁺ que coincidió con el aumento del porcentaje en la población total (Tabla 4.3.13.).

Tabla 4.3.13. Media de los valores de la serie blanca de los gatos FeLV⁺ y FIV⁺ que presentaban citopenias en cada una de las visitas del estudio con Roferon®. Leuc., número de leucocitos; Ntrf., número de neutrófilos; Linf., número de linfocitos.

Infección	Visita	Leuc.	Ntrf.	Linf.
FeLV	V0	3.490	1.300,5	1.145,4
	V1	4.200	1.849,6	869,3
	V2	4.550	1.659,2	826,0
	V3	4.930	2.200,0	1.060,3
FIV	V0	4.440	1.777,0	1.055,5
	V1	3.900	1.503,2	1.382,6
	V2	4.200	1.680,0	1.300,0
	V3	5.100	1.134,0	1.463,0

La neutrofilia y la linfocitosis detectadas no estuvieron ligadas con alteraciones en el frotis indicativas de procesos neoplásicos. El 47,1% de los gatos FeLV⁺ y el 50,0% de los FIV⁺ con neutrofilia presentaron signos clínicos relacionados con posibles infecciones secundarias como linfadenomegalia, conjuntivitis, lesiones orales o cutáneas, o alteraciones respiratorias.

4.3.2.3. Perfil bioquímico

Con respecto a los valores obtenidos en el análisis bioquímico, el porcentaje de alteración de la enzima ALT se mantuvo bajo y estable (0-8%) a lo largo del tratamiento. Sólo los gatos FeLV-07, -08 y FIV-25 presentaron elevados niveles de ALT a lo largo del estudio. De modo estable, pero en mayor porcentaje (13-24%), se mantuvieron los niveles alterados de urea en ambas infecciones durante el estudio con Roferon® (Figura 4.3.4.; Tabla 4.3.14.; Tabla 4.3.15.)

Sin embargo, el porcentaje de gatos con niveles altos de creatinina sí aumentó durante la V2 con respecto a la V0. En la V0 el porcentaje de alteración de la creatinina en los gatos FeLV⁺ fue del 0% y en los FIV⁺ del 6,45%, incrementándose en la V2 hasta el 23,5% y 13,0% respectivamente. Posteriormente, en la V3 los porcentajes disminuyeron en FeLV⁺ al 8,3% y se mantuvieron en FIV⁺ en el 12,5%.

Los valores de urea y creatinina se alteraron simultáneamente en los gatos FeLV-05, -09, -13 y FIV-02, -11, -25, -28 (Tabla 4.3.14.; Tabla 4.3.15.). En los siete gatos los valores de urea y creatinina se encontraban en el rango de la normalidad en la V0.

No se observaron diferencias significativas en la evolución de los parámetros bioquímicos estudiados según el sexo, la edad y el Grupo Clínico.

Tabla 4.3.14. Resultado y evolución con respecto a la V0 de la bioquímica sanguínea de los gatos FeLV⁺ incluidos en el estudio con Roferon®. Creat, creatinina; s/d, sin determinar.

G.C.	Código	Visita	Urea	Creat	ALT
1	FeLV-03	1	n-n	n-n	n-n
		2	n-n	n-n	n-n
	FeLV-07	1	n-n	n-n	n-↑
		2	n-n	n-n	n-n
		3	n-n	n-n	n-n
	FeLV-09	1	n-n	n-n	n-n
		2	n-↑	n-↑	n-n
		3	n-↑	n-↑	n-n
	FeLV-13	1	n-n	n-n	n-n
		2	n-↑	n-↑	n-n
	FeLV-16	1	s/d	s/d	s/d
		2	n-n	n-n	n-n
	FeLV-17	1	n-n	n-n	s/d
		2	n-↑	n-n	s/d
		3	n-n	n-n	n-n
	FeLV-18	1	↑-n	n-n	n-n
		3	↑-n	n-n	n-n
	FeLV-21	1	n-n	n-n	n-n
	FeLV-22	1	n-n	n-n	n-n
		2	n-n	n-n	n-n
		3	n-n	n-n	n-n
	FeLV-26	3	↑-n	n-n	n-n
	FeLV-27	1	n-↑	n-n	n-n
		2	n-n	n-n	n-n
		3	n-n	n-n	n-n
2	FeLV-02	1	n-n	n-n	n-n
		2	n-n	n-n	n-n
	FeLV-04	1	n-n	n-n	n-n
		2	s/d	s/d	s/d
	FeLV-05	1	n-n	n-n	n-n
		2	n-↑	n-↑	n-n
2 (cont.)	FeLV-08	1	↑-n	n-n	n-n
		2	↑-n	n-n	n-n
		3	↑-↑	n-n	n-↑
	FeLV-14	1	n-n	n-n	n-n
		2	n-n	n-n	n-n
		3	n-n	n-n	n-n
	FeLV-15	1	n-n	n-n	n-n
		2	s/d	s/d	s/d
	FeLV-19	1	n-n	n-n	n-n
		2	n-n	n-n	n-n
	FeLV-24	1	n-n	n-n	n-n
		2	n-n	n-n	n-n
		3	n-n	n-n	n-n
3	FeLV-01	1	↑-↑	n-n	n-n
		2	muerte		
	FeLV-06	1	↑-n	n-n	n-n
		2	s/d	s/d	s/d
	FeLV-10	1	n-n	n-n	n-n
		2	muerte		
	FeLV-11	1	n-n	n-n	n-n
		2	s/d	s/d	s/d
	FeLV-12	1	n-↑	n-n	n-n
		2	n-n	n-n	n-n
	FeLV-20	1	n-n	n-n	n-n
		2	n-n	n-↑	n-n
		3	n-n	n-n	n-n
	FeLV-23	1	n-n	n-n	n-n
		2	s/d	s/d	s/d
		3	n-n	n-n	n-n
	FeLV-25	2	n-n	n-n	n-n

– Urea: n, ≤53 mg/dl; ↑, >53 mg/dl

– Creat.: n, ≤1,4 mg/dl; ↑, >1,4 mg/dl

– ALT: n, ≤58 U/l; ↑, >58 U/l

– Los resultados se representan con dos símbolos, el primero indica la situación inicial (V0) y el segundo la situación el día de la visita correspondiente.

– Código de colores (variación con respecto a la V0): “blanco”, mantenimiento la normalidad; “verde”, evolución favorable; “amarillo”, persistencia de la alteración; “rojo”, evolución desfavorable; “gris”, sin determinar.

Tabla 4.3.15. Resultado y evolución con respecto a la V0 de la bioquímica sanguínea de los gatos FIV⁺ incluidos en el estudio con Roferon®. Creat, Creatinina; s/d, sin determinar.

G.C.	Código	Visita	Urea	Creat	ALT
1	FIV-01	1	n-n	n-n	n-n
		2	n-n	n-n	n-n
		3	n-n	n-n	n-n
	FIV-05	1	n-n	n-n	n-n
		3	n-n	n-n	n-n
	FIV-11	1	n-n	n-n	n-n
		2	n-n	s/d	n-n
		3	n-↑	n-↑	n-n
	FIV-12	2	n-n	n-n	n-n
		3	n-n	n-n	n-n
	FIV-18	2	n-n	n-↑	n-n
		3	n-n	n-n	n-n
	FIV-23	1	n-n	n-n	n-n
		3	n-n	n-n	n-n
	FIV-25	2	s/d	s/d	s/d
		3	n-↑	n-↑	n-↑
	FIV-28	1	n-↑	n-n	n-n
		2	n-↑	n-↑	n-n
		3	n-n	n-n	n-n
	FIV-31	1	↑-n	n-n	n-n
		2	↑-n	n-n	n-n
2	FIV-02	1	n-↑	n-↑	n-n
		2	s/d	n-n	n-n
		3	n-n	n-n	n-n
	FIV-03	2	n-n	n-n	n-n
		3	n-n	n-n	n-n
	FIV-04	1	↑-n	n-n	n-n
		2	↑-n	n-n	n-n
	FIV-06	1	n-n	n-n	n-n
		2	n-n	n-n	n-n
		3	n-n	n-n	n-n
	FIV-09	2	↑-n	n-n	n-n
		3	↑-n	n-n	n-n
	FIV-10	1	n-n	n-n	n-n
		2	n-n	n-n	n-n
		3	n-n	n-n	n-n
	FIV-13	1	↑-n	n-n	↑-n
		3	↑-n	n-n	↑-n
2 (cont.)	FIV-16	1	n-n	n-n	n-n
	FIV-17	1	n-n	n-n	n-n
		2	n-n	n-n	n-n
	FIV-22	3	n-n	n-n	n-n
		1	↑-n	↑-n	n-n
		2	↑-↑	↑-↑	n-n
	FIV-27	3	↑-n	↑-n	n-n
		1	s/d	s/d	s/d
		2	n-↑	n-n	n-n
	FIV-29	3	n-n	n-n	n-n
		1	↑-n	n-n	n-n
		3	↑-n	n-↑	n-n
	FIV-30	2	n-n	n-n	n-n
		3	n-n	n-n	n-n
	FIV-07	1	n-n	n-n	n-n
		2	n-n	n-n	n-n
		3	n-n	n-n	n-n
	FIV-08	1	n-n	n-n	n-n
		2	n-n	n-n	n-n
		3	n-n	n-n	n-n
	FIV-14	2	n-n	n-n	n-n
		3	muerte		
	FIV-15	1	↑-n	↑-n	n-n
		2	s/d	s/d	s/d
	FIV-19	1	n-n	n-n	n-n
		2	n-n	n-n	n-n
		3	n-n	n-n	n-n
	FIV-20	1	n-↑	n-n	n-n
		2	n-↑	n-n	n-n
		3	n-↑	n-n	n-n
	FIV-21	1	n-n	n-n	n-n
		2	n-n	n-n	n-n
	FIV-24	1	n-n	n-n	n-n
		2	n-n	n-n	n-n
		3	n-n	n-n	n-n
	FIV-26	1	n-n	n-n	n-n
		2	n-n	n-n	n-n

- Urea: n, ≤53 mg/dl; ↑, >53 mg/dl
- Creat.: n, ≤1,4 mg/dl; ↑, >1,4 mg/dl
- ALT: n, ≤58 U/l; ↑, >58 U/l
- Los resultados se representan con dos símbolos, el primero indica la situación inicial (V0) y el segundo la situación el día de la visita correspondiente.
- Código de colores (variación con respecto a la V0): “blanco”, mantenimiento la normalidad; “verde”, evolución favorable; “amarillo”, persistencia de la alteración; “rojo”, evolución desfavorable; “gris”, sin determinar.

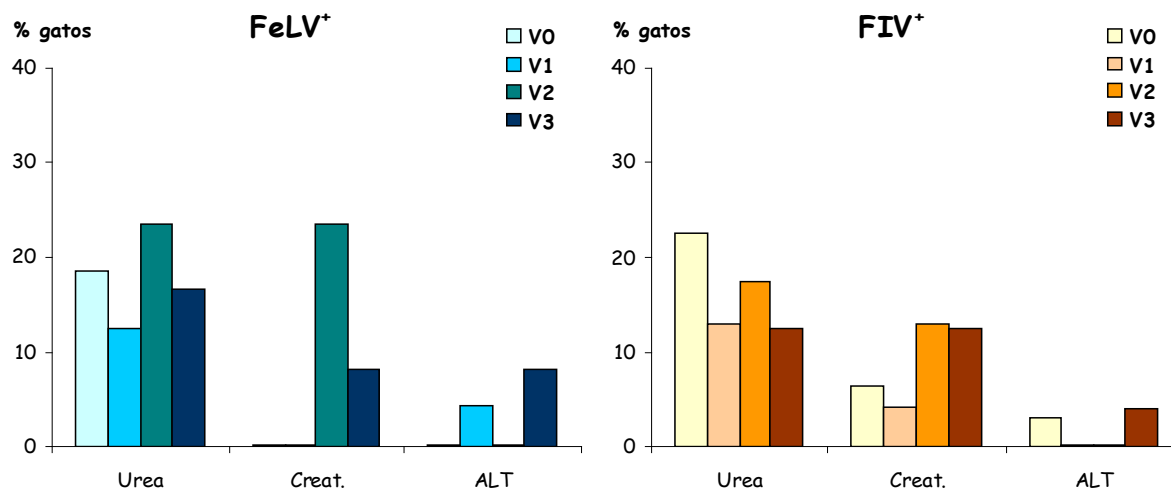


Figura 4.3.4. Porcentaje de alteración del perfil bioquímico de los gatos FeLV⁺ y FIV⁺ incluidos en el estudio con Roferon®. Creat., creatinina.

4.3.2.4. Análisis y electroforesis de las proteínas plasmáticas (proteinograma)

En ambas infecciones, aunque en mayor medida en los gatos FIV⁺, se produjo un aumento del porcentaje de gatos con valores de gammaglobulinas por encima de los límites de la normalidad (del 80,6% en la V0 al 100% en la V1 y la V2), lo que quedó también reflejado en el aumento del porcentaje de gatos con niveles altos de proteínas totales y con niveles bajos del cociente A/G (Tabla 4.3.16.; Tabla 4.3.17.). Los porcentajes de hipoalbuminemia e hiperalfaglobulinemia no sufrieron cambios significativos durante el estudio en comparación con V0 (Figura 4.3.5.; Tabla 4.3.18.).

Tabla 4.3.16. Resultado y evolución con respecto a la V0 del proteinograma de los gatos FeLV⁺ incluidos en el estudio con Roferon®. s/d, sin determinar; G.C., Grupo clínico.

G.C.	Código (FeLV-)	Visita	Proteínas totales	Albúmina	Alfa-globulinas	Gamma-globulinas	A/G
1	03	1	n-↑	n-n	n-n	n-↑	n-↓
		2	n-n	n-n	n-n	n-↑	n-↓
	07	1	n-n	n-n	n-n	n-n	n-n
		2	n-n	n-n	n-n	n-↑	n-n
	09	1	n-n	n-n	n-n	↑-↑	n-↓
		2	n-↑	n-n	n-n	↑-↑	n-↓
		3	n-↑	n-n	n-n	↑-↑	n-↓
	13	1	n-↑	n-n	n-n	n-↑	n-↓
		2	n-↑	n-n	n-n	n-↑	n-↓
	16	1	n-n	n-n	n-n	n-↑	n-n
		2	n-n	n-n	n-n	n-↑	n-n
	17	1	n-n	n-n	n-n	n-n	n-n
		2	n-n	s/d	n-n	n-↑	n-n
		3	n-↑	n-n	n-n	n-↑	n-n
	18	1	n-n	n-n	n-n	n-↑	n-n
		3	n-n	n-n	n-n	n-↑	n-n
	21	1	n-n	n-n	n-n	n-↑	n-↓
	22	1	n-n	s/d	s/d	s/d	s/d
		2	n-n	n-n	n-n	n-n	n-n
		3	n-↑	n-n	n-n	n-↑	n-n
	26	3	↑-n	n-n	n-n	↑-n	n-n
	27	1	↑-↑	n-n	↑-n	↑-↑	↓-↓
		2	↑-↑	n-n	↑-↑	↑-↑	↓-↓
		3	↑-n	n-n	↑-n	↑-↑	↓-↓
2	02	1	n-n	n-n	n-n	n-n	n-n
		2	n-n	n-n	n-n	n-n	n-n
	04	1	↑-n	n-n	n-↑	↑-↑	↓-↓
		2	s/d	s/d	s/d	s/d	s/d
	05	1	↑-↑	n-n	n-n	↑-↑	↓-n
		2	↑-↑	n-n	n-n	↑-↑	↓-↓
2 (cont.)	08	1	↑-↑	n-n	n-n	↑-↑	↓-↓
		2	↑-n	n-n	n-n	↑-n	↓-n
		3	↑-n	n-n	n-n	↑-↑	↓-↓
	14	1	n-n	n-n	n-n	↑-n	↓-n
		2	n-n	n-n	n-n	↑-n	↓-n
		3	n-n	n-n	n-n	↑-↑	↓-n
	15	1	n-↑	n-n	n-n	n-↑	n-↓
		2	n-↑	n-n	n-n	n-↑	n-↓
	19	1	↑-↑	n-n	n-n	↑-↑	n-↓
		2	↑-↑	n-n	n-n	↑-↑	n-↓
	24	1	n-↑	n-n	n-n	↑-↑	n-↓
		2	n-n	n-n	n-n	↑-↑	n-↓
		3	n-↑	n-n	n-n	↑-↑	n-↓
	01	1	↑-↑	↓-↓	↑-n	↑-↑	↓-↓
		2	muerte				
	06	1	↑-n	n-n	n-n	↑-↑	↓-↓
		2	↑-↑	n-n	n-n	↑-↑	↓-↓
	10	1	n-↑	n-n	n-n	n-↑	n-↓
		2	muerte				
	11	1	n-↑	n-n	n-n	n-↑	n-↓
		2	s/d	s/d	s/d	s/d	s/d
	12	1	n-↑	n-n	n-n	n-↑	n-↓
		2	n-↑	n-n	n-n	n-↑	n-↓
	20	1	n-↑	n-n	n-↑	n-↑	n-↓
		2	n-↑	n-n	n-n	n-↑	n-↓
		3	n-n	n-n	n-n	n-n	n-n
	23	1	n-↑	n-n	n-n	n-↑	n-↓
		2	n-n	s/d	s/d	s/d	s/d
		3	n-↑	s/d	s/d	s/d	s/d
	25	2	n-n	n-n	n-n	n-n	n-n

- Proteínas totales: n, ≤7,4 g/dl; ↑, >7,4g/dl
- Albúmina: n, ≥2,3 g/dl; ↓, <2,3g/dl
- Alfa-globulinas: n, ≤1,5 g/dl; ↑, >1,5g/dl
- Gamma-globulinas: n, ≤1,5 g/dl; ↑, >1,5g/dl
- A/G: n, ≥0,7; ↓, <0,7
- Los resultados se representan con dos símbolos, el primero indica la situación inicial (V0) y el segundo la situación el día de la visita correspondiente.
- Código de colores (variación con respecto a la V0): “blanco”, mantenimiento de la normalidad; “verde”, normalización de la alteración; “amarillo”, persistencia de la alteración; “rojo”, desarrollo de la alteración; “gris”, sin determinar.

Tabla 4.3.17. Resultado y evolución con respecto a la V0 del proteinograma de los gatos FIV⁺ incluidos en el estudio con Roferon®. s/d, sin determinar; G.C., Grupo clínico.

G.C.	Código (FIV-)	Visita	Proteínas totales	Albumina	Alfa-globulinas	Gamma-globulinas	A/G
1	01	1	n-↑	n-↓	n-n	↑-↑	n-↓
		2	n-↑	n-n	n-n	↑-↑	n-↓
		3	n-↑	n-n	n-n	↑-↑	n-n
	05	1	↑-↑	n-n	n-n	↑-↑	n-↓
		3	↑-n	n-n	n-n	↑-↑	n-↓
	11	1	↑-n	n-n	n-n	↑-↑	n-n
		2	↑-n	n-n	n-n	↑-↑	n-n
		3	↑-↑	n-↓	n-n	↑-↑	n-↓
	12	2	n-n	s/d	s/d	s/d	s/d
		3	n-n	↓-n	n-n	n-↑	↓-↓
	18	2	n-↑	n-n	n-n	n-↑	n-↓
		3	n-n	n-↓	n-n	n-↑	n-↓
	23	1	↑-↑	n-n	n-↑	↑-↑	↓-n
		3	↑-n	n-n	n-n	↑-↑	↓-n
	25	2	s/d	s/d	s/d	s/d	s/d
		3	↑-↑	n-n	n-↑	↑-↑	↓-n
	28	1	n-↑	n-n	n-↑	n-↑	n-n
		2	n-↑	n-n	n-n	n-↑	n-↓
		3	n-n	n-n	n-n	n-n	n-n
	31	1	n-↑	n-n	n-n	↑-↑	n-↓
		2	n-↑	n-n	n-n	↑-↑	n-↓
2	02	1	↑-↑	n-n	n-n	↑-↑	n-n
		2	↑-n	n-n	n-n	↑-↑	n-↓
		3	↑-↑	n-n	n-n	↑-↑	n-n
	03	2	↑-↑	n-n	↑-↑	↑-↑	n-↓
		3	↑-n	n-n	↑-n	↑-↑	n-n
	04	1	n-n	n-n	n-n	↑-↑	n-n
		2	n-n	n-n	n-n	↑-↑	n-n
	06	1	n-↑	n-n	n-↑	↑-↑	n-↓
		2	n-↑	n-n	n-n	↑-↑	n-n
		3	n-n	n-n	n-n	↑-↑	n-n
	09	2	↑-↑	n-n	n-n	↑-↑	↓-↓
		3	↑-n	n-n	n-n	↑-↑	↓-n
	10	1	n-↑	n-n	n-n	n-↑	n-↓
		2	n-n	n-n	n-n	n-↑	n-↓
		3	n-n	n-n	n-n	n-n	n-n
	13	1	n-n	n-n	n-n	↑-↑	↓-↓
		3	n-n	n-n	n-n	↑-n	↓-n
2 (cont.)	16	1	n-n	n-n	n-n	n-↑	n-n
		1	↑-n	n-n	↑-n	↑-↑	↓-n
		2	↑-↑	n-n	↑-n	↑-↑	↓-↓
	17	3	↑-n	s/d	s/d	s/d	s/d
		1	↑-n	n-n	n-n	↑-↑	n-n
		2	↑-↑	n-n	n-n	↑-↑	n-↓
	22	3	↑-↑	n-n	n-n	↑-↑	n-↓
		1	↑-↑	n-n	n-n	↑-↑	↓-↓
		2	↑-↑	n-n	n-n	↑-↑	↓-↓
	27	3	↑-n	n-n	n-n	↑-n	↓-n
		1	↑-↑	n-n	n-n	↑-↑	n-↓
		3	↑-↑	n-n	n-n	↑-↑	↓-↓
	29	1	↑-↑	n-n	n-n	↑-↑	n-↓
		3	↑-↑	n-n	n-n	↑-↑	n-↓
	30	2	n-↑	n-n	n-n	↑-↑	↓-↓
		3	n-↑	n-n	n-n	↑-↑	↓-↓
	07	1	n-↑	n-n	n-n	↑-↑	n-↓
		2	n-↑	n-n	n-n	↑-↑	n-↓
		3	n-↑	n-n	n-n	↑-↑	n-n
	08	1	n-n	n-n	n-n	↑-↑	n-n
		2	n-↑	n-n	n-n	↑-↑	n-↓
		3	n-n	n-n	n-n	↑-n	n-n
	14	2	↑-↑	s/d	s/d	s/d	s/d
		3	muerte				
	15	1	↑-↑	n-n	n-↑	↑-↑	↓-↓
		2	s/d	s/d	s/d	s/d	s/d
	19	1	n-n	n-n	n-n	n-↑	n-n
		2	n-↑	n-n	n-n	n-↑	n-↓
		3	n-n	n-n	n-n	n-↑	n-n
	20	1	n-↑	n-n	n-n	↑-↑	n-↓
		2	n-↑	n-n	n-n	↑-↑	n-↓
		3	n-n	n-n	n-n	↑-↑	n-n
	21	1	↑-n	n-n	n-n	↑-↑	↓-n
		2	↑-n	n-n	n-n	↑-↑	↓-n
		3	↑-n	n-n	n-n	↑-↑	↓-n
	24	1	↑-↑	n-n	n-n	↑-↑	↓-↓
		2	↑-↑	n-n	n-n	↑-↑	↓-↓
		3	↑-↑	n-n	n-n	↑-↑	n-↓
	26	1	↑-↑	n-n	n-n	↑-↑	n-↓
		2	↑-↑	n-n	n-n	↑-↑	n-↓

- Proteínas totales: n, ≤7,4 g/dl; ↑, >7,4g/dl

- Albumina: n, ≥2,3 g/dl; ↓, <2,3g/dl

- Alfa-globulinas: n, ≤1,5 g/dl; ↑, >1,5g/dl

- Gamma-globulinas: n, ≤1,5 g/dl; ↑, >1,5g/dl

- A/G: n, ≥0,7; ↓, <0,7

- Los resultados se representan con dos símbolos, el primero indica la situación inicial (V0) y el segundo la situación el día de la visita correspondiente.

- Código de colores (variación con respecto a la V0): "blanco", mantenimiento de la normalidad; "verde", normalización de la alteración; "amarillo", persistencia de la alteración; "rojo", desarrollo de la alteración; "gris", sin determinar.

En los gatos FeLV⁺, el mayor aumento de gammaglobulinas y de proteínas totales se apreció en la V1 (del 40,7% de gatos con hipergammaglobulinemia en la V0 al 83,3% en la V1 y del 29,6% de gatos con concentraciones elevadas de proteínas totales en la V0 al 56,0% en la V1). Este incremento se mantuvo constante en las sucesivas visitas, en torno al 70-80% de hipergammaglobulinemia y al 40-55% de hiperproteinemia. Sin embargo, la disproteinemia (A/G disminuido), a pesar de aumentar durante la V1 (del 25,9% al 70,8%), se redujo gradualmente en las visitas 2 y 3 hasta alcanzar niveles próximos a los iniciales (36,4%) (Figura 4.3.5.; Tabla 4.3.18.).

En los gatos FIV⁺, el 100% de los gatos estudiados presentaron hipergammaglobulinemia durante las visitas 1 y 2; además, la hiperproteinemia y la disproteinemia aumentaron progresivamente durante estas visitas, alcanzando su máximo en la V2 (70,8% y 77,3% respectivamente). Durante la V3 se observó que los porcentajes de hiperproteinemia, hipergammaglobulinemia y disproteinemia fueron similares o inferiores a los obtenidos antes de instaurar el tratamiento (37,5%, 77,3% y 34,8% respectivamente) (Figura 4.3.5.; Tabla 4.3.18.).

Tabla 4.3.18. Porcentaje de alteración del proteinograma de los gatos FeLV⁺ y FIV⁺ incluidos en el estudio con Roferon®.

Alteración del proteinograma	FeLV ⁺ % (n)				FIV % (n)			
	V0	V1	V2	V3	V0	V1	V2	V3
Hiperproteinemia	29,6 (8)	56,0 (14)	45,0 (9)	41,7 (5)	51,6 (16)	58,3 (14)	70,8 (17)	37,5 (9)
Hipoalbuminemia	3,7 (1)	4,2 (1)	0,0	0,0	3,2 (1)	4,2 (1)	0,0	8,7 (2)
Hiperalfaglobulinemia	7,4 (2)	8,3 (2)	5,3 (1)	0,0	6,4 (2)	16,7 (4)	4,6 (1)	4,6 (1)
Hipergammaglobulinemia	40,7 (11)	83,3 (20)	73,7 (14)	81,8 (9)	80,6 (25)	100 (24)	100 (22)	77,3 (18)
Disproteinemia	25,9 (7)	70,8 (17)	57,9 (11)	36,4 (4)	38,7 (12)	50,0 (12)	77,3 (17)	34,8 (8)

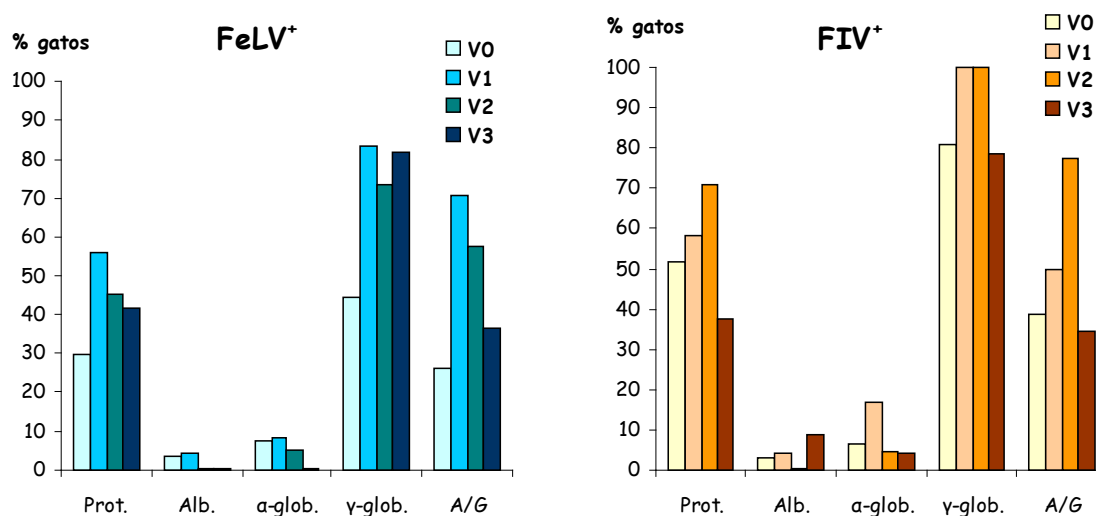


Figura 4.3.5. Porcentaje de alteración del proteinograma de los gatos FeLV⁺ y FIV⁺ incluidos en el estudio con Roferon®. Alteraciones: Prot., hiperproteinemia; Alb., hipoalbuminemia; α-glob., hiperalfaglobulinemia; γ-glob., hipergammaglobulinemia; A/G, disproteinemia o A/G disminuido.

Aproximadamente el 80% de los gatos FeLV⁺ con valores normales de gammaglobulinas en el momento de iniciar el tratamiento desarrollaron hipergammaglobulinemia a lo largo del estudio (76,9% en la V1, 72,7% en la V2 y 80,0% en la V3). En los gatos FIV⁺ este porcentaje fue mayor, ya que el 100% de los gatos con valores normales de gammaglobulinas en la V0 desarrollaron hipergammaglobulinemia en la V1 y V2, y en la V3 este porcentaje se redujo al 60,0%. El 70,6% de los gatos FeLV⁺ con el cociente A/G normal durante la V0 presentaron durante la V1 el cociente A/G alterado, mientras que en los gatos FIV⁺ el 81,3% de los gatos con el cociente A/G normal presentaron el cociente A/G alterado durante la V2 (Tabla 4.3.19.).

Solamente tres gatos FeLV⁺ (FeLV-08, -14, -26) y tres FIV⁺ (FIV-08,-13,-27) retornaron a la normalidad los valores de gammaglobulinas; y en el caso de FIV⁺ siempre durante la V3 (Tabla 4.3.16.; Tabla 4.3.17.; Tabla 4.3.19.).

Tabla 4.3.19. Evolución del proteinograma de los gatos FeLV⁺ y FIV⁺ incluidos en el estudio con Roferon®.

Infección	Evolución	Proteínas totales			γ-globulinas			Cociente A/G		
		V1	V2	V3	V1	V2	V3	V1	V2	V3
FeLV ⁺	normal-alterado	9 (50,0)	5 (33,3)	5 (75,0)	10 (76,9)	8 (72,7)	4 (80,0)	12 (70,6)	8 (57,1)	2 (25,0)
	alterado -normal	2 (28,6)	1 (20,0)	3 (100,0)	1 (9,1)	2 (25,0)	1 (16,7)	2 (28,6)	2 (40,0)	1 (33,3)
FIV	normal-alterado	7 (58,3)	10 (76,9)	4 (33,3)	4 (100,0)	4 (100,0)	3 (60,0)	9 (52,9)	13 (81,3)	5 (33,3)
	alterado -normal	5 (41,7)	4 (36,4)	6 (50,0)	0	0	3 (16,7)	4 (57,1)	2 (33,3)	5 (62,5)

El porcentaje se ha calculado en el caso de gatos con evolución “normal-alterado” a partir del número de gatos con una situación inicial normal y en los gatos con evolución “alterado-normal” a partir del número de gatos con una situación inicial alterada.

Se calculó la gammaglobulinemia media de los gatos FeLV⁺ y FIV⁺ tratados con Roferon®. En FeLV⁺, el valor medio aumentó un 34,7% en la V1 con respecto al valor medio de la V0; en la V2 y V3 el valor medio se redujo con respecto a la V1 pero se mantuvo en valores superiores a los observados en la V0 (Tabla 4.3.20.). La evolución de la gammaglobulinemia en los gatos FIV⁺ fue diferente a la de FeLV⁺; en este caso el valor medio fue máximo en la V2, un 61,4% mayor que el obtenido en la V0. En la V3 el valor medio de gammaglobulinas descendió con respecto a la V2 hasta un valor similar al obtenido en la V0 (Tabla 4.3.20.).

Tabla 4.3.20. Gammaglobulinemia media y porcentaje de variación con respecto a la V0 de los gatos FeLV⁺ y FIV⁺ incluidos en el estudio con Roferon®.

Visita	FeLV ⁺		FIV ⁺	
	Valor medio	% variación	Valor medio	% variación
V0	2,05		2,46	
V1	2,76	+ 34,7	3,13	+ 27,3
V2	2,68	+ 30,9	3,97	+ 61,4
V3	2,30	+ 12,2	2,46	0

En ambas infecciones, los altos niveles de urea y creatinina estuvieron ligados a elevados niveles de gammaglobulinas (salvo en la V0 en el gato FeLV-18), es decir, cuando se presentaron niveles por encima del

límite de la normalidad de urea y/o en creatinina estuvieron siempre acompañados por altos niveles de gammaglobulinas; sin embargo, no todas las hipergammaglobulinemias estaban acompañadas de altos niveles de urea y creatinina. En los gatos FeLV⁺ sí se observó que la disminución de gammaglobulinas y de urea plasmática estaban asociadas ($p < 0,05$).

Por otro lado, no se observó una correlación estadísticamente significativa entre la evolución de las gammaglobulinas y la de los parámetros virológicos p27, RT y carga provírica en gatos FeLV⁺ ni entre las gammaglobulinas y la carga provírica en FIV⁺.

4.3.2.5. Cociente de poblaciones CD4⁺/CD8⁺.

Se realizó el seguimiento del cociente CD4⁺/CD8⁺ tras el tratamiento con Roferon®. Debido a que para realizar este análisis, las muestras debían estar en perfecto estado, y que esta prueba se realizaba en un servicio externo que no siempre estaba disponible, no se pudieron realizar en algunos casos las determinaciones requeridas. Los resultados de estas pruebas se representan en las Tablas 4.3.21. y 4.3.22.

Tabla 4.3.21. Evolución con respecto a la V0 del cociente CD4⁺/CD8⁺ en la sangre periférica de los gatos FeLV⁺ incluidos en el estudio con Roferon®. s/d, sin determinar; G.C., Grupo clínico.

G.C.	Código	V1	V2	V3
1	FeLV-03	↑	↑	s/d
	FeLV-07	s/d	=	=
	FeLV-09	=	↑	s/d
	FeLV-13	↓	↓	s/d
	FeLV-16	↑	↑	s/d
	FeLV-17	=	=	s/d
	FeLV-18	=	s/d	=
	FeLV-21	=	s/d	s/d
	FeLV-22	↑	s/d	↑
	FeLV-26	s/d	s/d	↑
2	FeLV-02	=	s/d	s/d
	FeLV-04	s/d	↑	s/d
	FeLV-05	=	=	s/d
	FeLV-08	↑	↑	=
	FeLV-14	s/d	↑	↑
	FeLV-15	↑	↑	s/d
	FeLV-19	s/d	s/d	s/d
	FeLV-24	s/d	=	=
	FeLV-01	↑	muerte	
	FeLV-06	s/d	s/d	s/d
3	FeLV-10	s/d	muerte	
	FeLV-11	↑	↑	s/d
	FeLV-12	s/d	s/d	s/d
	FeLV-20	s/d	s/d	=
	FeLV-23	=	↑	↑
	FeLV-25	s/d	↑	s/d

- Considerando (variación con respecto a la V0): ↑, incremento mayor al 20% del cociente; ↓, disminución mayor del 20% del cociente; =, variación igual o inferior al 20% del cociente; s/d, sin determinar.
- Código de colores (variación con respecto a la V0): “verde”, incremento mayor al 20% del cociente; “rojo”, disminución mayor del 20% del cociente; “blanco”, variación igual o inferior al 20% del cociente; “gris”, sin determinar.

Tabla 4.3.22. Evolución con respecto a la V0 del cociente $CD4^+/CD8^+$ en la sangre periférica de los gatos FIV⁺ incluidos en el estudio con Roferon®. s/d, sin determinar; G.C., Grupo clínico.

G.C.	Código	V1	V2	V3
1	FIV-01	↑	↑	↑
	FIV-05	↑	s/d	=
	FIV-11	↑	↑	↑
	FIV-12	s/d	s/d	s/d
	FIV-18	s/d	↑	=
	FIV-23	↑	s/d	=
	FIV-25	s/d	s/d	↓
	FIV-28	↑	s/d	s/d
	FIV-31	↓	=	s/d
2	FIV-02	s/d	s/d	s/d
	FIV-03	s/d	↑	s/d
	FIV-04	↑	↑	s/d
	FIV-06	↑	s/d	↑
	FIV-09	s/d	↑	↑
	FIV-10	↑	s/d	s/d
	FIV-13	↑	s/d	s/d
2 (cont.)	FIV-16	↑	s/d	s/d
	FIV-17	s/d	↑	↑
	FIV-22	↑	↑	↑
	FIV-27	s/d	s/d	s/d
	FIV-29	s/d	s/d	↑
	FIV-30	s/d	↑	↓
3	FIV-07	↑	↑	=
	FIV-08	s/d	s/d	s/d
	FIV-14	s/d	↑	muerte
	FIV-15	↑	↓	s/d
	FIV-19	↑	=	=
	FIV-20		↑	s/d
	FIV-21	↑	s/d	s/d
	FIV-24	s/d	s/d	s/d
	FIV-26	s/d	=	s/d

- Considerando (variación con respecto a la V0): ↑, incremento mayor al 20% del cociente; ↓, disminución mayor del 20% del cociente; =, variación igual o inferior al 20% del cociente; s/d, sin determinar.
- Código de colores (variación con respecto a la V0): “verde”, incremento mayor al 20% del cociente; “rojo”, disminución mayor del 20% del cociente; “blanco”, variación igual o inferior al 20% del cociente; “gris”, sin determinar.

Se produjo un aumento del valor medio del cociente $CD4^+/CD8^+$ en ambas infecciones víricas tras el tratamiento con Roferon® (Tabla 4.3.23.). En los gatos FeLV⁺ el valor medio aumentó en mayor medida entre las Visitas 1 y 2 siendo máxima en la V3 (2,38); mientras que en FIV⁺ el mayor incremento se produjo entre las visitas 0 y 1 y fue máxima en la V2 (1,40).

Tabla 4.3.23. Valor medio del cociente $CD4^+/CD8^+$ durante el tratamiento con Roferon® (valor normal $\geq 0,9$)

Infección	V0	V1	V2	V3
FeLV ⁺	1,66	1,79	2,11	2,38
FIV ⁺	0,80	1,17	1,40	1,29

El porcentaje de animales con valores inferiores a 0,9 (valor normal) también descendió con el tratamiento tanto en los gatos FeLV⁺ como en los FIV⁺. En los FeLV⁺ durante la V3 no hubo gatos con porcentajes alterados, mientras que en los FIV⁺ un 20,0 y 35,0% se mantuvieron alterados en la V2 y V3, respectivamente (Tabla 4.3.24.).

Tabla 4.3.24. Porcentaje de gatos con $CD4^+/CD8^+$ inferiores a 0,9 durante el tratamiento con Roferon®

Infección	V0	V1	V2	V3
FeLV ⁺	26,1	10,0	5,3	0
FIV	69,2	30,0	20,0	35,0

Durante las tres visitas se observó un importante porcentaje de gatos FeLV⁺ en los que aumentó su cociente CD4⁺/CD8⁺ con respecto a V0 (Figura 4.3.6.; Tabla 4.3.21.). En la V2 fue cuando el porcentaje de gatos con una evolución favorable fue mayor (64,7%). Solamente en un gato en la V1 (FeLV-13) y dos en la V2 (FeLV-13 y -20) disminuyó el cociente CD4⁺/CD8⁺ un 20% con respecto a la V0.

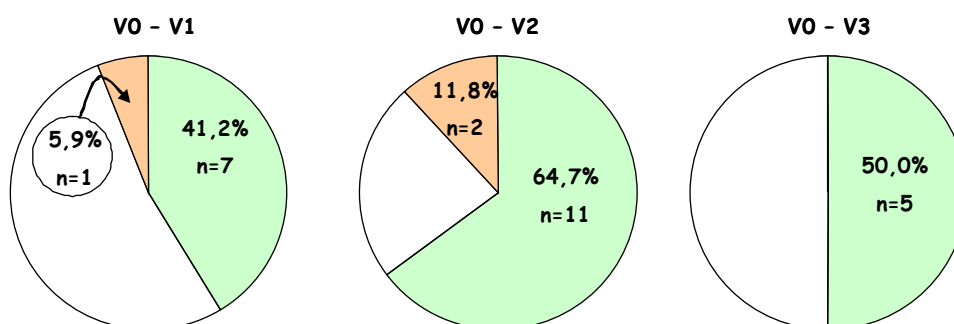


Figura 4.3.6. Evolución del cociente CD4⁺/CD8⁺ en sangre periférica de los gatos FeLV⁺ incluidos en el estudio con Roferon® con respecto a V0.

Código de colores: “rojo”, evolución desfavorable, reducción del cociente CD4⁺/CD8⁺ más de un 20% con respecto V0; “verde”, evolución favorable, incremento del cociente CD4⁺/CD8⁺ más de un 20% con respecto V0; “blanco”, estable, variación inferior al 20% del cociente CD4⁺/CD8⁺ con respecto V0.

En el caso de los gatos FIV⁺, el porcentaje de gatos en los que incrementaba su cociente CD4⁺/CD8⁺ fue máximo en la V1, ya que en un 93,8% de los gatos aumentó dicho cociente más de un 20% con respecto a la V0. El porcentaje de gatos en los que aumentó el cociente CD4⁺/CD8⁺ disminuyó paulatinamente en cada una de las visitas 75,0% en la V2 y 50,0% en la V3. Por otro lado, se redujo el cociente CD4⁺/CD8⁺ en cuatro gatos, uno durante la V1 (FIV-31), otro durante la V2 (FIV-15) y otros dos en la V3 (FIV-25 y 30) (Figura 4.3.7.; Tabla 4.3.22.).

En los gatos FeLV⁺ no se observó correlación entre el cociente CD4⁺/CD8⁺ y la evolución de los parámetros víricos concentración de proteína p27 y actividad RT. Tampoco se observó correlación entre el cociente CD4⁺/CD8⁺ y la carga provírica en los gatos FeLV⁺ y FIV⁺.

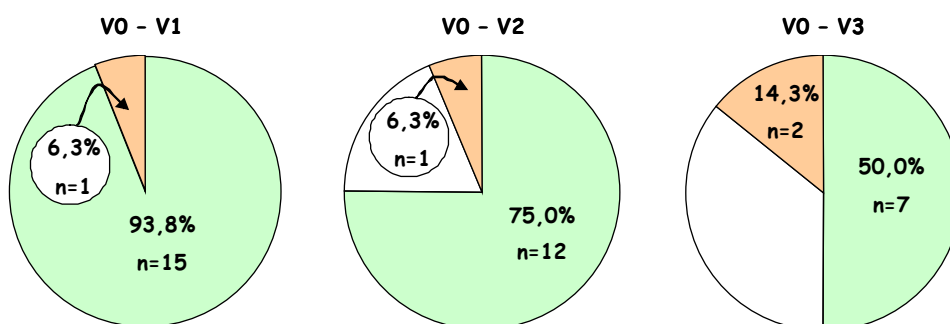


Figura 4.3.7. Evolución del cociente CD4⁺/CD8⁺ en sangre periférica de los gatos FIV⁺ incluidos en el estudio con Roferon® con respecto a V0.

Código de colores: “rojo”, evolución desfavorable, reducción del cociente CD4⁺/CD8⁺ más de un 20% con respecto V0; “verde”, evolución favorable, incremento del cociente CD4⁺/CD8⁺ más de un 20% con respecto V0; “blanco”, estable, variación inferior al 20% del cociente CD4⁺/CD8⁺ con respecto V0.

4.3.2.6. Detección de anticuerpos anti-interferón α

No se observó el desarrollo de anticuerpos anti-interferón α en los gatos tratados con Roferon® mediante la técnica ELISA utilizada.

4.3.3. Resultados y seguimiento de la infección vírica de la población incluida en el ensayo con Roferon®

4.3.3.1. Proteínas víricas p27

Se determinó la proteína de la cápsida p27 en el plasma de los gatos FeLV⁺ a lo largo del tratamiento con Roferon® mediante un ELISA tipo sándwich (3.2.11.). Se compararon los valores obtenidos en las Visitas 1, 2 y 3 con los hallados en la V0 (Tabla 4.3.25.).

Durante las Visitas 1 y 2, se produjo una disminución en la concentración de p27 en 60,0% y 59,1% de los gatos, respectivamente, frente a 32,0% y 27,3% de gatos en los que aumentó (Figura 4.3.8.). Si se considera mejoría relativa como el porcentaje de gatos en los que se reduce la concentración de p27 menos el porcentaje de gatos en los que aumenta, durante la V1 y V2 esta mejoría relativa fue de aproximadamente el 30%. Sin embargo, durante la V3 en un 66,7 % de los gatos aumentó la concentración de p27 frente al 16,7 % en los que se redujo, por lo tanto, se produjo al igual que en los valores de la hematología (apartados 4.3.2.1. y 4.3.2.2.) un relativo “efecto rebote” del tratamiento con interferón sobre la presencia de p27 en sangre.

Tabla 4.3.25. Evolución de la concentración de p27 con respecto a la V0 en el plasma de los gatos FeLV⁺ incluidos en el estudio con Roferon®. s/d, sin determinar; G.C., Grupo clínico.

G.C.	Código	V1	V2	V3
1	FeLV-03	↓	↓	s/d
	FeLV-07	↓	↓	↑
	FeLV-09	↓	↓	↓
	FeLV-13	↑	↓	s/d
	FeLV-16	↑	↑	s/d
	FeLV-17	↓	↑	↑
	FeLV-18	↑	s/d	=
	FeLV-21	↓	s/d	s/d
	FeLV-22	↓	↓	↑
	FeLV-26	s/d	s/d	↑
	FeLV-27	↑	↑	↑
2	FeLV-02	↑	=	s/d
	FeLV-04	↓	↓	s/d
	FeLV-05	↓	↓	s/d

G.C.	Código	V1	V2	V3
2 (cont.)	FeLV-08	↓	↓	=
	FeLV-14	↑	↑	↑
	FeLV-15	↓	=	s/d
	FeLV-19	↓	↓	s/d
	FeLV-24	↓	↑	↑
3	FeLV-01	↑	muerte	
	FeLV-06	↓	↓	s/d
	FeLV-10	↑	muerte	
	FeLV-11	=	=	s/d
	FeLV-12	↑	↑	s/d
	FeLV-20	↓	↓	↓
	FeLV-23	=	↓	↑
	FeLV-25	s/d	↓	s/d

- Considerando (variación con respecto a la V0): ↑, incremento mayor al 20%; ↓, disminución mayor al 20%; =, variación igual o inferior al 20%; s/d, sin determinar.
- Código de colores (variación con respecto a la V0): “rojo”, incremento mayor al 20%; “verde”, disminución mayor al 20%; “blanco”, variación igual o inferior al 20%; “gris”, sin determinar.

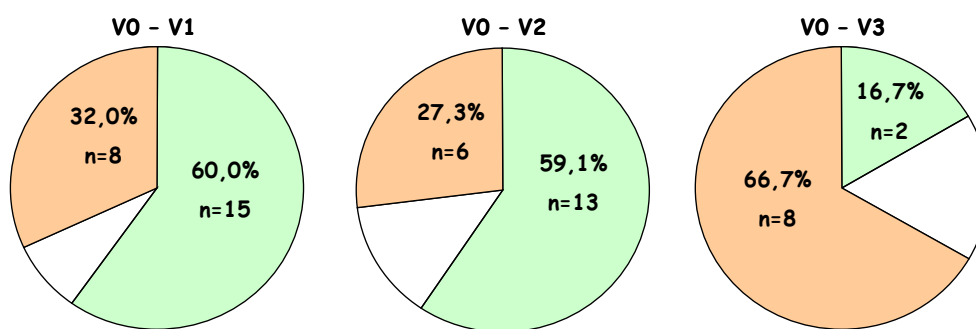


Figura 4.3.8. Evolución de la proteína p27 en el plasma de los gatos FeLV⁺ incluidos en el estudio con Roferon®. Código de colores: “rojo”, evolución desfavorable; “verde”, evolución favorable; “blanco”, estable.

Además, durante el estudio con Roferon® se observó una reducción del valor medio de la concentración de p27 durante la V1 y la V2, 18,1% y 23,6% respectivamente (Tabla 4.3.26.); sin embargo, durante la V3 se observó que la media aumentó un 31,5%. Por lo tanto, en la V3 hubo un empeoramiento de la situación con respecto a la V0, a pesar de que existió una mejoría durante la V1 y la V2.

Tabla 4.3.26. Media y porcentaje de aumento o reducción de la misma con respecto V0 de la proteína p27 en los gatos FeLV⁺ incluidos en el estudio con Roferon®.

	V0	V1	V2	V3
Media (mg/μl)	0,525	0,430	0,401	0,691
% respecto V0		- 18,1%	- 23,6 %	31,5 %

No se observaron diferencias estadísticamente significativas en la evolución entre los grupos clínicos, salvo que entre la V0 y la V1 el porcentaje de gatos en los que se redujo la concentración de p27 fue mayor en los Grupos 1 y 2 (70,0 y 75,0 %, respectivamente) que en el Grupo 3 (28,6%) ($p < 0,05$).

En la V2, se detectaron diferencias en los valores de p27 entre el grupo de machos y de hembras ($p < 0,10$); por un lado, se redujo la cantidad de p27 en mayor proporción en el grupo de los machos (70,0%) que en el de las hembras (50,0%), y por otro, el porcentaje de hembras en las que aumentó la concentración de esta proteína (41,7%) fue mayor que en el de los machos (10,0%) (Tabla 4.3.27.).

Tabla 4.3.27. Evolución de la concentración de p27 en machos y hembras en los gatos FeLV⁺ durante la V2 del estudio con Roferon®.

Sexo	Estable n (%)	Incremento n (%)	Reducción n (%)
Hembras (12)	1 (8,3)	5 (41,7)	6 (50,0)
Machos (10)	2 (20,0)	1 (10,0)	7 (70,0)

4.3.3.2. Actividad retrotranscriptasa (RT) de FeLV

De igual modo que con la proteína p27, se realizó un seguimiento de la actividad RT en el plasma de los gatos FeLV⁺ a lo largo del tratamiento con Roferon® (Tabla 4.3.28.). En este caso, se observó un menor porcentaje de gatos con variaciones, aumentos y disminuciones de actividad, que los obtenidos con la p27.

Tabla 4.3.28. Evolución de la actividad RT con respecto a la V0 en el plasma de los gatos FeLV⁺ incluidos en el estudio con Roferon®. s/d, sin determinar; G.C., Grupo clínico.

Actividad RT positiva en la V0					Actividad RT negativa en la V0				
G.C.	Código	V1	V2	V3	G.C.	Código	V1	V2	V3
1	FeLV-03	↓	↓	s/d	1	FeLV-13	=	=	s/d
	FeLV-07	↓	↓	=		FeLV-16	=	=	s/d
	FeLV-09	↓	↓	↓		FeLV-17	=	=	=
	FeLV-21	↓	s/d	s/d		FeLV-18	=	s/d	=
	FeLV-26	s/d	s/d	↓		FeLV-22	=	=	↑
2	FeLV-02	↑	↓	s/d		FeLV-27	↑	↑	↑
	FeLV-04	↓	↓	s/d	2	FeLV-08	=	=	↑
	FeLV-05	↓	↓	s/d		FeLV-14	=	=	=
	FeLV-15	↓	=	s/d		FeLV-24	=	↑	=
	FeLV-19	↓	↓	s/d					
3	FeLV-01	=	muerte						
	FeLV-06	↓	↓	s/d					
	FeLV-10	=	muerte						
	FeLV-11	↓	=	s/d					
	FeLV-12	=	↑	s/d					
	FeLV-20	↓	=	↑					
	FeLV-23	↓	↓	↓					
	FeLV-25	s/d	s/d	↓					

- Considerando (variación con respecto a la V0): ↑, incremento mayor al 20%; ↓, disminución mayor al 20%; =, variación igual o inferior al 20%; s/d, sin determinar.
- Código de colores (variación con respecto a la V0): “rojo”, incremento mayor al 20%; “verde”, disminución mayor al 20%; “blanco”, variación igual o inferior al 20%; “gris”, sin determinar.

a) Gatos con un resultado positivo a la RT en la V0 (Figura 4.3.9.).

En el 75% y el 71,4% de los gatos se redujo la actividad RT con relación a la V0 durante la V1 y V2, respectivamente. Este porcentaje se redujo al 40% en la V3. Solamente en un gato en cada una de las visitas aumentó la actividad RT (FeLV-02 en la V1, FeLV-12 en la V2 y FeLV-20 en la V3).

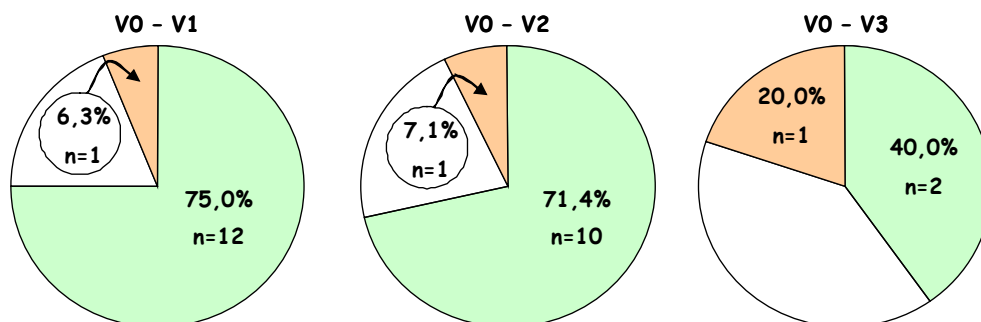


Figura 4.3.9. Evolución de la actividad RT en el plasma de los gatos FeLV⁺ con actividad RT positiva en la V0 incluidos en el estudio con Roferon®. Código de colores: “rojo”, evolución desfavorable; “verde”, evolución favorable; “blanco”, estable.

b) Gatos con un resultado negativo a la RT en la V0 (Figura 4.3.10.).

Se obtuvieron resultados positivos en cuatro gatos sin actividad RT en la V0; en FeLV-24 durante la V2, en FeLV-8 y FeLV-22 durante la V3 y en FeLV-27 se mantuvo la positividad desde V1 a V3.

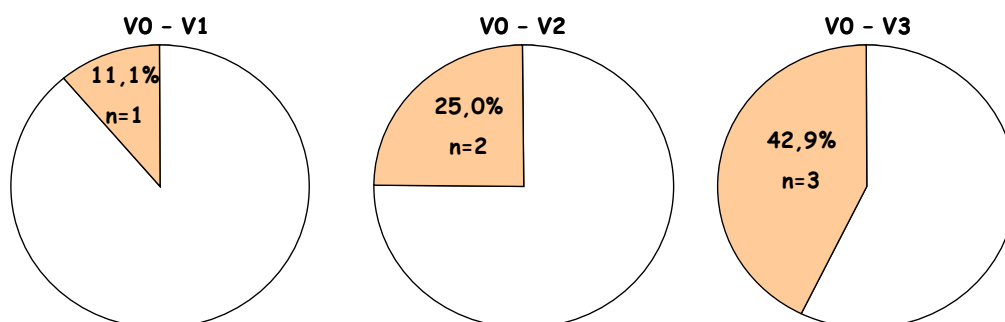


Figura 4.3.10. Evolución de la actividad RT en el plasma de los gatos FeLV⁺ sin actividad RT en la V0 incluidos en el estudio con Roferon®. Código de colores: “rojo”, evolución desfavorable; “blanco”, se mantiene negativo.

En estos resultados se advierte que el número de gatos sin actividad RT detectable fue mayor en las tres visitas en comparación con la V0, siendo máxima durante la V1, cuando en el 72,0 % de los plasmas felinos no se detectó la actividad de esta proteína. Este porcentaje se mantuvo estable en la V2 (68,2%), reduciéndose posteriormente hasta el 41,7%, valor próximo al observado en la V0 (Tabla 4.3.29.), un efecto similar a lo observado en otros parámetros y que hemos denominado “efecto rebote”.

Tabla 4.3.29. Número y porcentaje de gatos FeLV⁺ sin actividad RT FeLV⁺ detectable en el estudio con Roferon®.

	V0	V1	V2	V3
n (%)	9 (33,3)	18 (72,0)	15 (68,2)	5 (41,7)

Además de aumentar el porcentaje de gatos con actividad RT negativa, también disminuyó la cantidad de esta proteína en los gatos en los que sí se detectó. Esta reducción fue máxima durante la V2, ya que la media bajó un 96,15% con respecto a la V0 (Tabla 4.3.30.).

Tabla 4.3.30. Media de los resultados positivos de la actividad RT y porcentaje de reducción con respecto a la V0 de los gatos FeLV⁺ incluidos en el estudio con Roferon®.

	V0	V1	V2	V3
Media (mU/ml)	5,507	3,490	0,212	2,175
% respecto V0		- 36,62%	- 96,15%	- 60,50%

En este caso, y a diferencia de en la V0, no se observaron diferencias significativas en la evolución de la actividad RT con respecto a los diferentes Grupos Clínicos, la edad y el sexo.

4.3.3.3. Carga provírica de FeLV

Se realizó el seguimiento de la cantidad de provirus en sangre circulante mediante la técnica de PCR a tiempo real, de modo que se pudo evaluar si aumentaba o disminuía con respecto al tratamiento. Hay que recordar que en esta técnica, Ct es el ciclo umbral o ciclo en el que se empieza a detectar la señal, que es más bajo (o antes) cuanto mayor sea la carga vírica. Al igual que en p27 y RT se consideró que aumentaba o disminuía cuando el porcentaje Virus/GAPDH variaba un 20% con respecto al valor de la V0 (Tabla 4.3.31.).

Los resultados obtenidos mediante PCR a tiempo real muestran que la carga provírica disminuyó en un 40,0% de los gatos en la V1, en el 59,1% en la V2 y en el 33,3% en la V3. Por lo tanto, el mayor porcentaje de mejoría se produjo durante la V2. El porcentaje de gatos en los que aumentó la carga provírica permaneció constante a lo largo de todo el estudio, aproximadamente el 15% de los gatos (16,0% en V1, 13,6% en V2 y 16,7% en V3 (Figura 4.3.11.).

El porcentaje relativo de mejoría (gatos en los que disminuyó la carga provírica menos gatos en los que aumentó) fue del 24,0% entre la V0 y la V1, y un 45,5% entre la V0 y la V2 y del 16,6% entre la V0 y la V3.

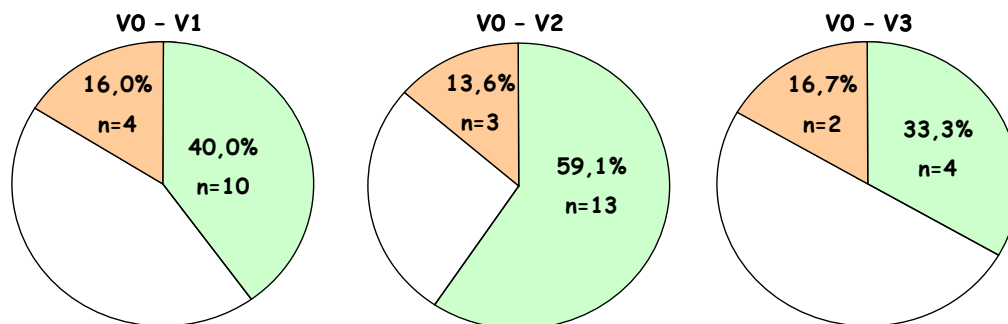


Figura 4.3.11. Evolución de carga provírica en sangre periférica de los gatos FeLV⁺ incluidos en el estudio con Roferon®. Código de colores: “rojo”, evolución desfavorable; “verde”, evolución favorable; “blanco”, estable.

Tabla 4.3.31. Evolución de la carga provírica (FeLV/GAPDH) con respecto a la V0 en sangre periférica de los gatos FeLV⁺ incluidos en el estudio con Roferon®. s/d, sin determinar; G.C., Grupo clínico.

G.C.	Código	V1	V2	V3
1	FeLV-03	↓	↓	s/d
	FeLV-07	=	↑	=
	FeLV-09	↓	↓	↓
	FeLV-13	=	↓	s/d
	FeLV-16	↑	↓	s/d
	FeLV-17	=	↓	↑
	FeLV-18	↓	s/d	=
	FeLV-21	=	s/d	s/d
	FeLV-22	=	↓	↑
	FeLV-26	s/d	s/d	↓
	FeLV-27	↑	↑	=
2	FeLV-02	=	=	s/d
	FeLV-04	↓	↓	s/d
	FeLV-05	=	=	s/d
3 (cont.)	FeLV-08	↓	=	=
	FeLV-14	↑	↓	↓
	FeLV-15	↓	=	s/d
	FeLV-19	↓	↓	s/d
	FeLV-24	=	↓	=
	FeLV-01	=	muerte	
	FeLV-06	↓	=	s/d
	FeLV-10	↓	muerte	
	FeLV-11	=	=	s/d
	FeLV-12	↑	↑	s/d
	FeLV-20	↓	↓	=
	FeLV-23	=	↓	↓
	FeLV-25	s/d	↓	s/d

- Considerando (variación con respecto a la V0): ↑, incremento mayor al 20%; ↓, disminución mayor al 20%; =, variación igual o inferior al 20%; s/d, sin determinar.
- Código de colores (variación con respecto a la V0): “rojo”, incremento mayor al 20%; “verde”, disminución mayor al 20%; “blanco”, variación igual o inferior al 20%; “gris”, sin determinar.

Al calcular la media de la relación del Ct de FeLV/GAPDH se observó que durante la V1 y la V2 se produjo un aumento de esta relación, es decir, una disminución del valor medio de la carga provírica (ya que a menor Ct, mayor carga provírica, por lo que ya hay una relación inversa inherente). De esta manera la carga provírica

fue mínima en la V2. En la V3 la relación FeLV/GAPDH fue muy parecida a la observada en la V0 (Tabla 4.3.32.).

Tabla 4.3.32. Media del cociente FeLV/GAPDH de los gatos FeLV⁺ incluidos en el estudio con Roferon®.

	V0	V1	V2	V3
Media	0,681	0,753	0,816	0,692

Como ocurrió con la proteína p27, se observó una respuesta diferente entre el grupo de machos y de hembras ($p<0,05$) durante la V2. El número de copias províricas se redujo en el 70% de los machos y sólo en el 50% de las hembras. En ningún macho aumentó la carga provírica, mientras que en tres hembras se produjo este incremento entre la V0 y la V2 (25,0%) (Tabla 4.3.33.).

Tabla 4.3.33. Evolución en ambos sexos de la carga provírica de los gatos FeLV⁺ durante la V2 del estudio con Roferon®.

Sexo (n)	Mantiene n (%)	Incremento n (%)	Reducción n (%)
Hembras (12)	3 (25,0)	3 (25,0)	6 (50,0)
Machos (10)	3 (30,0)	0 (0,0)	7 (70,0)

Las gatas FeLV-12 y -27 fueron las únicas en las que aumentaron los tres parámetros víricos (el número de copias províricas, la actividad RT y la proteína p27); en el caso de FeLV-27 este aumento se acompañó de un incremento de los glóbulos blancos y un descenso de las gammaglobulinas.

La evolución de la concentración de la proteína p27 y la carga provírica de FeLV⁺ fue paralela; es decir, cuando la concentración p27 aumentó o disminuyó también lo hizo, en el mismo sentido, la carga provírica de FeLV⁺, y viceversa ($p<0,05$).

4.3.3.4. Carga provírica de FIV

Al igual que en los gatos FeLV⁺, se realizó el seguimiento de la cantidad de provirus en sangre circulante mediante PCR a tiempo real, para evaluar si aumentaba o disminuía la proporción de este provirus con el tratamiento (Tabla 4.3.34.).

El efecto del Roferon® sobre la carga provírica fue mucho menor en los gatos FIV⁺ que en los FeLV⁺ (Figura 4.3.12.). En la V1 el número de gatos en los que disminuyó la carga provírica fue del 29,2% frente al 40,0% de FeLV⁺. En la V1 fue cuando se produjo la máxima mejoría de este parámetro, reduciéndose posteriormente al 15,4% en la V2 y al 8,3% en la V3. Por otro lado, el porcentaje de gatos en los que aumentó la carga provírica fue también inferior a los porcentajes que se obtuvieron en FeLV⁺, ningún caso en la V1, un caso en la V2 (FIV-27) y dos en la V3 (FIV-06, 30).

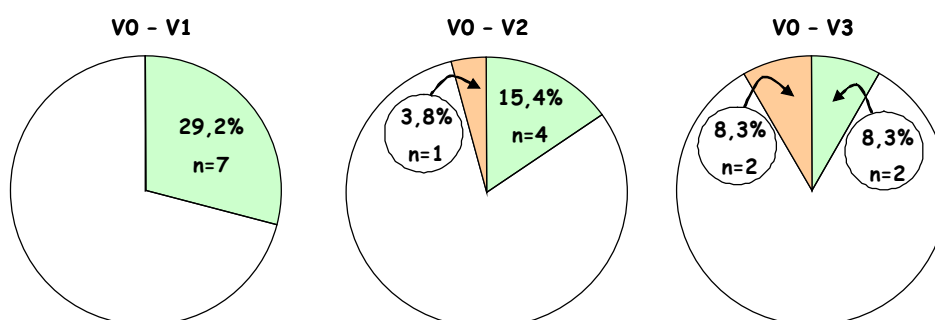


Figura 4.3.12. Evolución de la carga provírica en sangre periférica de los gatos FIV⁺ incluidos en el estudio con Roferon®. Código de colores: “rojo”, evolución desfavorable; “verde”, evolución favorable; “blanco”, estable.

Tabla 4.3.34. Evolución de la carga provírica (FIV/GAPDH) con respecto a la V0 en sangre periférica de los gatos FIV⁺ incluidos en el estudio con Roferon®. s/d, sin determinar; G.C., Grupo clínico.

G.C.	Código	V1	V2	V3
1	FIV-01	=	=	=
	FIV-05	=	s/d	=
	FIV-11	=	=	=
	FIV-12	s/d	=	↓
	FIV-18	s/d	=	=
	FIV-23	=	s/d	=
	FIV-25	s/d	=	=
	FIV-28	↓	↓	↓
	FIV-31	=	=	=
2	FIV-02	=	=	=
	FIV-03	=	=	=
	FIV-04	↓	=	s/d
	FIV-06	=	=	↑
	FIV-09	s/d	↓	=
	FIV-10	↓	↓	=
	FIV-13	↓	s/d	=
2 (cont.)	FIV-16	↓	s/d	s/d
	FIV-17	=	=	=
	FIV-22	↓	=	=
	FIV-27	=	↑	=
	FIV-29	=	s/d	=
	FIV-30	s/d	=	↑
3	FIV-07	=	=	=
	FIV-08	=	=	=
	FIV-14	s/d	=	muerte
	FIV-15	=	=	s/d
	FIV-19	=	=	=
	FIV-20	=	=	=
	FIV-21	=	=	s/d
	FIV-24	=	=	=
	FIV-26	↓	↓	s/d

- Considerando (variación con respecto a la V0): ↑, incremento mayor al 20%; ↓, disminución mayor al 20%; =, variación igual o inferior al 20%; s/d, sin determinar.
- Código de colores (variación con respecto a la V0): “rojo”, incremento mayor al 20%; “verde”, disminución mayor al 20%; “blanco”, variación igual o inferior al 20%; “gris”, sin determinar.

El gato FIV-28 fue el único en el que la carga proviral se mantuvo disminuida con respecto a la V0 en todas las visitas. Los gatos FIV-10 y FIV-26 mantuvieron la reducción de la carga vírica solamente durante las visitas 1 y 2, aunque de éste último no se pudo determinar en la V3. Los demás gatos que mejoraron lo hicieron durante la V1 retornando a valores similares a los de la V0 en las siguientes visitas, a excepción de FIV-12 que mejoró su resultado durante la V3.

Como cabía esperar, la media de la relación virus FIV/GAPDH permaneció prácticamente estable a lo largo del estudio, al contrario de lo que ocurrió en los gatos FeLV⁺ (Tabla 4.3.35.).

Tabla 4.3.35. Media del cociente virus FIV⁺/GAPDH de los gatos FIV⁺ incluidos en el estudio con Roferon®.

	V0	V1	V2	V3
Media	0,825	0,920	0,871	0,856

Debido al escaso número de gatos en los que se produjeron variaciones de la carga provírica no se han podido establecer diferencias significativas con respecto a los grupos clínicos, sexos y/o edad.

4.3.3.5. Resultados conjuntos de la virología en los gatos FeLV⁺

El análisis en conjunto de todos los parámetros víricos (p27, RT, carga provírica) que miden la evolución de la infección por FeLV en la población de gatos incluidos en el ensayo con Roferon® se muestra en las Tablas 4.3.36. y 4.3.37.

Tabla 4.3.36. Media y porcentaje de variación con respecto a V0 de la proteína p27, la actividad RT y la carga vírica de los gatos FeLV⁺ incluidos en el estudio con Roferon®.

Parámetros víricos		V0	V1	V2	V3
p27	Media	0,525	0,430	0,401	0,691
	% variación		- 18,1%	- 23,6 %	31,5 %
RT	Media	5,507	3,490	0,212	2,175
	% variación		- 36,6%	- 96,2%	- 60,5%
Carga provírica (FeLV/GAPDH)	Media	0,681	0,753	0,816	0,692
	% variación		- 10,6%	- 19,8%	- 1,6%

Tabla 4.3.37. Evolución favorable y desfavorable con respecto a V0 de la proteína p27, la actividad RT y la carga provírica de los gatos FeLV⁺ incluidos en el estudio con Roferon®.

		V0-V1		V0-V2		V0-V3	
		Favorable	Desfavor.	Favorable	Desfavor.	Favorable	Desfavor.
p27		60,0 %	32,0 %	59,1 %	27,3 %	16,7 %	66,7 %
RT	Con V0 positivo	75,0 %	6,3 %	71,4 %	7,1 %	40,0 %	20,0 %
	Con V0 negativo	-	11,1 %	-	25,0 %	-	42,9 %
Carga provírica		40,0 %	16,0 %	59,1 %	13,6 %	33,3 %	16,7 %

En cuanto a la evolución de los parámetros, el porcentaje de gatos con una evolución favorable fue mayor durante la V1 y V2 no observándose diferencias significativas en sus porcentajes (Tabla 4.3.36.). Sin embargo, en la V2 fue cuando se produjo una mayor reducción de la media de la p27, la RT y la carga vírica, 23,6%, 96,2% y 19,8%, respectivamente, lo que parece indicar que es el momento donde hay una mayor respuesta al tratamiento (Tabla 4.3.37.). En la V3 se redujo de forma significativa el porcentaje de animales con una evolución favorable y se incrementó el de animales con una evolución desfavorable. Esto mismo ocurrió con los valores medios, produciéndose de nuevo el efecto rebote descrito para otros parámetros (Tabla 4.3.36. y 4.3.37.).

DISCUSIÓN

5.1. Estudios *in vitro*

Los IFNs de tipo I han sido utilizados en el tratamiento de las retrovirosis debido a que mejoran los parámetros virológicos en los estudios *in vivo* e *in vitro*. Así, en células infectadas inhiben la replicación de HIV-1 (Shirazi y Pitha, 1992; Agy y col., 1995), producen apoptosis en células infectadas por HTLV-I (Feng y col., 2003), reducen la carga vírica en el Virus de la Leucemia Murina, MuLV (Aboud y col., 1981; Gerlach y col., 2006), y reducen la carga vírica y provírica en el Virus Maedi-Visna, MVV (Juste y col., 1996). Sin embargo, no existen estudios sobre la acción del IFN en FeLV y muy poco sobre FIV, por lo que se desconoce actualmente la acción de esta citoquina sobre estos retrovirus felinos.

Para poder comprender correctamente el efecto del IFN *in vivo* y su mecanismo de acción, en el presente trabajo se realizaron estudios de su acción *in vitro* sobre células infectadas por FeLV o por FIV. En los estudios *in vitro* se utilizaron dos subtipos de interferón para los análisis con FIV y tres con los de FeLV. Los diferentes subtipos de interferón son muy parecidos bioquímicamente en cada especie; sin embargo, se han observado diferencias significativas en su potencia y efecto biológico (Belardelli y col., 2002). Los dos que se utilizaron en común, rHuIFN- α (2a) y rFeIFN- ω , están incluidos en las formulaciones terapéuticas Roferon® y Virbagen®, respectivamente. Roferon® fue formulado para terapéutica humana y en gatos se ha utilizado empíricamente en el tratamiento de las retrovirosis, mientras que el Virbagen® es de origen felino y se utiliza en la terapéutica de pequeños animales. El interferón omega felino se ha propuesto como alternativa al interferón recombinante humano, ya que se observó que altas dosis de este último (rHuIFN- α (2a)) podían inducir la formación de anticuerpos anti-IFN en los gatos (Zeidner y col., 1990a).

Debido a que las formulaciones comerciales tienen excipientes que podían modificar sus efectos, se eligió un tercer subtipo, rHuIFN(A/D), para completar los estudios de FeLV. rHuIFN(A/D) es un purificado comercial para uso laboratorial de un híbrido de IFN- α A e IFN- α D humano, que está considerado como el “Interferón Universal” debido a que tiene funcionalidad en células de otras especies (Belardelli y col., 2002). Sin embargo, no se emplea en la clínica veterinaria por su elevado coste. Los resultados demostraron que fue más potente que los otros dos, posiblemente, como se ha mencionado además de otras razones que se exponen más abajo, por la presencia de excipientes en los preparados terapéuticos (Roferon®: acetato amónico, cloruro sódico, bencilo, polisorbato 80, ácido acético e hidróxido sódico; Virbagen®: cloruro sódico, D-sorbitol y gelatina).

En cuanto a las concentraciones elegidas en los ensayos, en los primeros estudios con FeLV se emplearon diluciones de 20-200.000 UI/ml de rHuIFN- α (2a) y de 30-300.000 U/ml de rFeIFN- ω . En los estudios con FIV, a fin de simplificar la comparación de resultados y de homogeneizar, se estimó realizar las mismas diluciones para ambos subtipos, utilizando un rango de concentraciones ligeramente inferior a FeLV, en donde se habían observado diferencias estadísticamente significativas entre la concentración más diluida y las células no tratadas.

5.1.1. Efecto sobre la expresión de los virus

El sobrenadante libre de células de los cultivos celulares se usó para cuantificar dos parámetros víricos que ofrecen diferente información: por una lado las proteínas víricas estructurales (p27 en FeLV y p24 en FIV), y por el otro, la actividad RT.

Las proteínas p24 y p27 son utilizadas *in vivo* como indicadores de viremia en los gatos. En FeLV p27 puede detectarse en sangre periférica de gatos infectados y es utilizada para el diagnóstico. Sin embargo, en FIV p24 no se puede emplear con dicho fin, debido a que los métodos disponibles hoy en día no son capaces de detectar la baja concentración de la misma que se presenta en el plasma (Gómez-Lucía y col., 2006).

La cuantificación de las proteínas de la cápsida de los retrovirus puede utilizarse como indicador de la síntesis proteica. En el caso de FeLV, se ha descrito que la proteína p27 es producida y eliminada al medio

extracelular en exceso (Jarrett, 1995), incluso sin asociarse a partículas infecciosas. En FIV, es posible que ocurra una situación similar aunque no se ha descrito esta circunstancia hasta el momento.

Los resultados sugieren que los interferones utilizados no afectan a la síntesis de proteínas víricas, por lo menos en lo que se refiere a p24 y p27, pues permanece constante con las diferentes concentraciones y subtipos de interferón empleados, lo que coincide con lo observado en otros retrovirus como HTLV-I (Feng y col., 2003), el Virus de la Leucemia Murina de Moloney (MoMuLV), (Aboud y col., 1981) o HIV (Gendelman y col., 1990). Sin embargo, Coccia y col. (1994) describieron un aumento de la concentración de p25 intracelular en células infectadas por HIV, pero un descenso en el sobrenadante celular; por tanto, la disminución de la síntesis proteica parece estar más ligada a un defecto en la eliminación de partículas víricas que a una disminución de la síntesis proteica.

Esta falta de alteración en la síntesis proteica puede residir en la ausencia de un elemento de respuesta a interferón (ISRE) en la región promotora de FIV y de FeLV. Los interferones de tipo I actúan en la célula gracias a una cascada enzimática que forma un trímero (ISGF-3), el cual se dirige al núcleo y se une a los elementos del ADN llamados ISREs (*Interferon Stimulating Response Elements*) en la región promotora de los genes estimulados por el IFN y que poseen una secuencia consenso NAGTTTCNNTTTCNC/T (Williams, 1991) (apartado 1.4.4.).

Los estudios *in silico* utilizando el programa Refinement (Tsukahara y col., 2006) identificaron en el genoma de la cepa Rickard de FeLV-A (GenBank número AF052723) la presencia de una secuencia comenzando en el nucleótido 798, en el gen que codifica para la proteína precursora gPR80 en la región *gag-pol* del virus, compatible con la secuencia consenso de ISRE. Esta situación dentro del genoma no afecta a la expresión vírica debido a que no se sitúa en una región de inicio de la transcripción ni en una región reguladora como los LTR. Por tanto, no es sorprendente que la síntesis proteica no se altere por el empleo del IFN. Este hecho viene también corroborado por los resultados de la expresión de ARNm vírico, cuantificado por PCR a tiempo real, ya que no se observaron diferencias con las distintas concentraciones de IFN o con el tiempo de tratamiento (apartados 4.1.1.2. y 4.1.2.2.). Esta misma búsqueda se realizó sobre el genoma de la cepa Petaluma de FIV (GenBank número M25381), no hallándose ninguna secuencia compatible con la consenso de ISRE, lo que explicaría por qué la síntesis proteica de FIV no se afecta con el empleo de IFN.

Al analizar el efecto de los IFN sobre FIV y FeLV, tan importante como determinar cómo se afecta la expresión vírica es comprobar si las partículas víricas que geman de la célula tienen capacidad infectiva y transmitirían la infección a otras células. Para valorar dicho parámetro, en este trabajo se ha empleado la actividad RT (retrotranscriptasa) de cada virus (Niermann y Buehring, 1997), puesto que tan sólo las partículas que tengan actividad RT son infecciosas, al contrario de lo que ocurre con las proteínas estructurales, que pueden formar parte de partículas defectivas o incluso no estar asociada a viriones. Los resultados con ambos virus han puesto de manifiesto que la actividad RT en el sobrenadante de las células infectadas disminuye con el uso de interferón (apartados 4.1.2.2. y 4.1.4.2.). Se ha determinado que el efecto del interferón depende tanto del tiempo de exposición al fármaco como de su concentración. En ambos casos se observó menor actividad RT a más tiempo de incubación y mayor concentración de interferón. El subtipo de interferón también influyó en la actividad RT: el resultado de la IC₅₀ de FeLV mostró que el rHuIFN(A/D) fue el más efectivo en la reducción de la actividad RT, mientras que el rHuIFN- α (2a) fue el menos efectivo (apartados 4.1.2.2. y 4.1.4.2.). Por tanto, los interferones empleados, aunque no afectaron a la síntesis proteica, sí que disminuyeron marcadamente el número de partículas víricas infectivas en los sobrenadantes celulares, por lo que se puede asumir que su empleo terapéutico estaría indicado.

En el caso de las células FL74 infectadas crónicamente por FeLV se observaron diferencias significativas en los valores RT tras 48 horas de tratamiento respecto a las células no tratadas; en FIV sin embargo las diferencias se hallaron tras 72 horas de tratamiento. Este desfase temporal podría ser debido al diferente estado del virus en las células. En el caso de FL74, FeLV se encuentra integrado en las propias células. Por ello puede transcribirse y replicarse más rápidamente y en mayor cantidad que FIV, que debe infectar las células y luego replicarse y expresar las proteínas estudiadas. Esto explicaría por qué la actividad RT puede

cuantificarse tras 24h de tratamiento en el experimento con FeLV y sin embargo, en FIV son necesarias 48h para poderse detectar esta actividad con la técnica utilizada. Otra posible explicación se basaría en que FIV es un lentivirus, y como tal, dotado de una serie de genes reguladores que pueden interferir sobre la acción del IFN, de los que carece FeLV.

Nuestros resultados en FIV coinciden con lo observado por otros autores (Tanabe y Yamamoto, 2001). El descenso de la actividad RT también ha sido observado durante el tratamiento con interferón en células infectadas por otros retrovirus, como en el caso de HIV-1 (Gendelman y col., 1990; Schroder y Müller, 1994), o HTLV-I (Feng y col., 2003). Sin embargo, no se han realizado estudios similares con FeLV.

5.1.2. Efecto sobre la viabilidad y la apoptosis celular

Como el tratamiento con interferón disminuyó el número de partículas víricas infectivas pero no afectó a la síntesis proteica podría sospecharse que su papel sea a nivel post-transcripcional, en las últimas fases de la virogénesis: en la maduración, ensamblaje y/o liberación de partículas víricas. Por este motivo, se analizó el efecto que el interferón pudiera tener sobre la viabilidad celular. Para analizar este efecto se tiñeron las células con anexina e ioduro de propidio (IP), método que ha sido propuesto por otros autores (McCoubrie y col., 2004; Tejerizo y col., 2005; Gibellini y col., 2008) como apropiado para identificar células apoptóticas y diferenciarlas de las células necróticas. Es importante señalar dos aspectos relevantes para entender los porcentajes de viabilidad, necrosis y apoptosis:

- La anexina V es una proteína que se adhiere a la fosfatidilserina, la cual se encuentra en la cara interna de la membrana plasmática, pero que se expone en la cara externa cuando comienza el proceso de apoptosis, mientras que el IP solamente puede penetrar por ósmosis en las células muertas cuya membrana es permeable.
- Los resultados de necrosis y apoptosis registrados en este estudio fueron recogidos en un instante determinado, es decir, no se ha seguido el proceso de muerte celular. Por tanto, el porcentaje de células necróticas está compuesto, no sólo por células que han muerto por un proceso de necrosis, sino que también se incluyen en él las células que han muerto por procesos de apoptosis pero cuya membrana ya está muy alterada y permite la entrada del IP (apoptosis tardía).

El proceso de muerte celular fue diferente en las células infectadas por FeLV y en las infectadas por FIV. En las primeras hubo un claro predominio de apoptosis, que se empezó a desarrollar ya desde las primeras 48 horas de incubación. Sin embargo, en FIV el interferón apenas indujo apoptosis y la viabilidad descendió por un proceso de muerte por necrosis. Esto parece sugerir que en las células infectadas por FeLV el interferón actúa de forma combinada con el virus para inducir el proceso de muerte.

En el caso de las células infectadas por FIV (FeTJ-FIV_{GL8}), se observó, al igual que en las células FeTJ no infectadas, disminución de la viabilidad. Sin embargo, al contrario de lo que cabría esperar, se observó que el porcentaje de reducción de viabilidad fue menor en las células infectadas; esto puede ser debido a que el virus podría poseer algunos de los mecanismos que le permiten evadirse del efecto del interferón (apartado 1.4.7.).

Por tanto, los resultados parecen mostrar que el interferón, actuando sinérgicamente con el virus, induce cambios intracelulares y/o alteraciones de la membrana que desembocan en la muerte celular, bien por apoptosis en el caso de FeLV, o bien por necrosis en el caso de FIV, que podrían reducir la formación de partículas víricas (evaluadas indirectamente por la actividad RT) posiblemente por un defecto en la gemación del virus a través de la membrana celular. Esto limitaría la expansión de la infección a otras células y permitiría la muerte selectiva de las células infectadas.

El mecanismo por el que desciende el número de partículas víricas infectivas en presencia de IFN no es del todo entendido hasta el momento. Otros autores han observado un fenómeno similar al que reflejan nuestros datos. Así, en MuLV y en HIV se ha propuesto que el IFN puede interferir en el procesamiento de las proteínas

y en su ensamblaje en los viriones, pero no en la síntesis de proteínas (Aboud y col., 1981; Dianzani y col., 1998). En HTLV-I se ha sugerido que la virogénesis deficiente pueda estar relacionada con la asociación de Gag con las balsas lipídicas de la membrana, su acción sobre las chaperonas, o la modificación post-traduccion de las proteínas Gag (Feng y col., 2003; Feng y Ratner, 2008). También podría relacionarse con la alteración de la integridad de la membrana plasmática que podría afectar a las últimas fases de la virogénesis impidiendo la gemación. Nuestros resultados están en consonancia con lo defendido por otros autores que afirman que la actividad antiretroviral del IFN se produce durante la maduración y el ensamblaje (Gendelman y col., 1990; Dianzani y col., 1998; Okumura y col., 2006; Feng y Ratner, 2008). Las partículas víricas liberadas tienen una infectividad menor que las no tratadas con interferón (Hansen y col., 1992). Incluso algunos autores han observado que las partículas se acumulan junto a la membrana plasmática y tienen alterada su morfogénesis (Dianzani y col., 1998; Okumura y col., 2006). Por otro lado, los resultados de Shirazi y Pitha (1992) parecen indicar que el interferón podría actuar inhibiendo eficazmente las primeras fases de la replicación proviral, disminuyendo los niveles de ARN. Estas diferencias podrían ser debidas al grado de maduración de las células infectadas, siendo en las más inmaduras en las que se afectan etapas más tempranas de la virogénesis (Shirazi y Pitha, 1992).

En ausencia de infección, la viabilidad de las células FeTJ también se redujo tras 72 horas de tratamiento, aumentando la necrosis. Esto podría ser debido al efecto antiproliferativo del interferón. Estos resultados parecen estar en consonancia con los de Baldwin y col. (2004b) que observaron como el rFeIFN- α disminuía la viabilidad celular y aumentaba la necrosis y la apoptosis de células FeTJ, aunque su mecanismo no está claro (apartado 1.4.8.). En cualquier caso, se reduciría el nivel de reposición de células viables y, por tanto, porcentualmente aumentarían el número de células necróticas y apoptóticas. Este efecto antiproliferativo podría estar relacionado con el tipo celular (Baldwin y col., 2004b), ya que la viabilidad de las células U937 no infectadas no se alteró con el tratamiento de interferón con las concentraciones y tiempos utilizados.

5.1.3. Comparación de los subtipos de interferón analizados

En FeLV, según la CC_{50} y la IC_{50} , tanto para viabilidad como para actividad RT, el rHuIFN(A/D) fue el más efectivo en la reducción e inhibición de la actividad RT, entre 3-20 veces más que rFeIFN- ω , y entre 300 y 1000 veces mayor que rHuIFN- $\alpha(2a)$ (Tabla 4.1.3.). Ambos IFN- α tienen un origen humano y una estructura muy similar. Sin embargo, rHuIFN(A/D) es considerado el “Interferón Universal”, y por ello podría tener mayor efecto en las células que el rHuIFN- $\alpha(2a)$ (Belardelli y col., 2002). Como se mencionó anteriormente, también el hecho de que se comercialice diluido con un excipiente determinado, formulado para que se conserve y para que alcance el tramo intestinal sin degradarse, podría influir en los resultados obtenidos.

La IC_{50} para la actividad RT del rFeIFN- ω fue inferior a la del rHuIFN- $\alpha(2a)$, entre 60 y 90 veces con FL74 (Tabla 4.1.3.) y 20 veces con FeTJ-FIV_{GL8} (Tabla 4.1.10). El origen de esta diferencia puede ser la especificidad interespecie del interferón, motivo por el cual el interferón recombinante felino sería más eficaz en células felinas que el interferón recombinante humano. Dado que no se han realizado pruebas *in vitro* con el rHuIFN(A/D) con FeTJ-FIV_{GL8} no se pueden comparar los resultados.

En FeTJ-FIV_{GL8} y en FL74 se observó que la IC_{50} de la actividad RT fue menor que la CC_{50} de la viabilidad, de modo que con la misma concentración de interferón se redujo en mayor proporción la actividad RT que la viabilidad celular (apartados 4.1.2.2., 4.1.2.3., 4.1.4.2. y 4.1.4.3.); esto parece indicar que los interferones tienen un mayor efecto sobre la reducción de la formación de partículas víricas infecciosas que en la disminución de la viabilidad celular. Este aspecto es interesante para el tratamiento *in vivo*, en el que disminuirían las partículas infectivas sin efectos indeseables sobre la viabilidad celular.

Por último, el interferón que posteriormente se analizó *in vivo*, rHuIFN- $\alpha(2a)$ fue más efectivo en las células infectadas por FeLV (FL74) que por FIV (FeTJ-FIV_{GL8}), lo que parece demostrarse por la mayor IC_{50} de FIV y por la obtención del mismo efecto con más tiempo de tratamiento (48 h en FeLV y 72 h en FIV). Este

mayor efecto sobre FeLV podría deberse a la presencia de la secuencia ISRE en el genoma de este virus o a la presencia de otros genes reguladores en FIV (apartado 1.3.1.1.) o por mecanismos de evasión.

En resumen, los distintos IFN empleados no afectaron visiblemente a la síntesis proteica viral, pero sí a la presencia de partículas infectivas libres, por lo que su efecto parece ser fundamentalmente en las fases de maduración y ensamblaje. En las células infectadas por FeLV, esto podría estar relacionado con la inducción de apoptosis y en las células infectadas por FIV con la inducción de necrosis por el efecto combinado del IFN con el virus.

5.2. Población de estudio y situación inicial de los gatos del estudio *in vivo* para valorar la eficacia del rFeIFN α (2a) (Roferon®) en el tratamiento de las infecciones por FIV y por FeLV

5.2.1. Reseña de la población felina

El 51,7% de la población felina incluida en el estudio eran machos. Sin embargo, cuando se analizó cada una de las infecciones por separado se observó que el 64,5% de la población FIV⁺ eran machos frente a un 40,7% de gatos FeLV⁺ (Tabla 4.2.3.). Se consideró dentro de lo esperado que el porcentaje de machos infectados por FIV fuera superior al número de hembras, debido a que los hábitos territoriales de los machos incrementan el riesgo de adquirir la infección, ya que las mordeduras son la principal vía de transmisión de la infección por FIV durante las peleas (Dunham y Graham, 2008; Hosie y col., 2009). Estos resultados son similares a los obtenidos en un estudio epidemiológico realizado por nuestro equipo de investigación en la Comunidad de Madrid (Arjona y col., 2000) y coinciden con los de otros autores (Natoli y col., 2005; Hosie y col., 2009; Gleich y Hartmann, 2009; Collado y col., 2012).

En la población FeLV⁺, la proporción de hembras y machos estuvo más igualada (59,3% y 40,7%, respectivamente; Tabla 4.2.3.). Sin embargo, en relación al estado reproductivo de los gatos se observó que los gatos machos enteros fueron los que estaban representados en menor porcentaje (11,1%), mientras que las gatas y gatos castrados representaban el 37,1 y 29,6%, respectivamente (Tabla 4.2.3.). Este resultado podría ser compatible con la propia epidemiología de la infección por FeLV en la que el virus es eliminado a través de la saliva y los gatos se infectan por vía oronasal a través del agua, los alimentos o el acicalamiento y lo descrito por otros autores con anterioridad (Gomes-Keller y col., 2006a y b; Dunham y Graham, 2008; Collado y col., 2012; Willett y Hosie, 2013). Los hábitos naturales y gregarios que presentan en mayor medida las gatas y gatos castrados, podrían facilitar el contagio de la infección, y favorecer así que sea en este grupo en el que hubiera mayor porcentaje de infección por FeLV.

Se observaron diferencias significativas en la distribución por edades de los gatos infectados por uno u otro virus. La media de edad de los gatos FeLV⁺ fue de 1,9 años. El grupo más numeroso fue el de menores de un año de edad (29,6%), y ninguno de los gatos superaba los siete años (Tabla 4.2.4). Estas tres características parecen indicar que los gatos se infectan por FeLV a edades tempranas y que desarrollan la infección en un plazo no superior a los 5 años, aproximadamente. Esta observación está en sintonía con lo descrito por otros autores, que han observado que el riesgo de infección está relacionado con la edad, siendo los jóvenes más susceptibles y los de mayor edad más resistentes (Hoover y col., 1977; Hartmann, 2008; Lutz y col., 2009; Willett y Hosie, 2013) y que la enfermedad se desarrolla, en la mayoría de los casos, en un periodo de tres años (Levy y col., 2008; Hartmann, 2011). Además, en un estudio epidemiológico previo realizado por nuestro equipo de investigación se demostró que la infección por FeLV es más frecuente en gatos jóvenes (Arjona y col., 2000).

Por otro lado, la media de edad de los gatos FIV⁺ fue superior a la de FeLV⁺ (4,8 años), siendo el grupo con mayor representación el de tres años (25,8%). Solamente el 9,7% de este grupo tenía menos de un año de edad, mientras que casi un tercio (29,0 %) de los gatos tenía más de siete años (Tabla 4.2.4.). Estos resultados fueron muy parecidos a los observados en un estudio realizado en la Comunidad de Madrid (Arjona y col., 2000). En este caso los resultados parecen señalar que los gatos se infectan con 2-3 años debido a una mayor actividad sexual y territorial, que aumenta el riesgo de infección por FIV a través de las mordeduras. La presencia de gatos mayores de siete años podría indicar que los gatos infectados pueden sobrevivir durante varios años. En los gatos FIV⁺ se ha descrito un periodo de latencia largo, de años, antes de desarrollar el

cuadro de inmunodeficiencia terminal; incluso en algunos casos, la fase de SIDA no llega a desarrollarse nunca (Sellon y Hartmann, 2008; Hartmann, 2012).

Las diferencias en la edad de adquisición de la infección y los distintos tiempos de evolución de la infección en los gatos FeLV⁺ y FIV⁺ son probablemente los dos factores que más influyen en la diferente distribución de edad que se observó en el presente estudio.

Debido a que la mayoría de los gatos (87,8%) eran de raza Común Europeo, no se pudo realizar un estudio sobre la influencia de la raza en el desarrollo de ambas retrovirosis.

El hábitat es un elemento esencial en la transmisión de la infección. Los gatos que salen al exterior tienen una mayor probabilidad de infectarse, ya que pueden contactar con gatos infectados. Sin embargo, en nuestro estudio el porcentaje de gatos con y sin acceso al exterior fue muy similar en ambas infecciones. Dado que sólo se ha analizado la población infectada, se desconoce si esta misma distribución se produciría en la no infectada o en ésta última predominarían los gatos sin acceso al exterior. De cualquier modo, se decidió no profundizar en el análisis debido a que en algunos casos los gatos habían tenido diferentes propietarios y por tanto, la salida o no al exterior no estuvo siempre controlada. Por último, más del 80% de los gatos de nuestro estudio eran vagabundos. En principio, parece razonable que los gatos que han vivido en la calle presenten una mayor probabilidad de haber contraído la infección. Sin embargo, al igual que ocurrió con el hábitat, el análisis de este parámetro fue muy dificultoso, puesto que, como se ha mencionado, en muchos casos los gatos habían tenido diferentes propietarios y el origen no estaba claro. Por estos motivos, se decidió no realizar un estudio más profundo con este parámetro.

En resumen y a la vista de nuestros resultados, las características asociadas al grupo de gatos FeLV⁺ fueron preferiblemente: gatos jóvenes, machos o hembras, castrados, de raza Común Europeo y de origen vagabundo; y en el grupo de los gatos FIV⁺ fueron: gatos adultos, machos, de raza Común Europeo y de origen vagabundo.

5.2.2. Situación clínica inicial de la población felina

Los signos clínicos observados durante la exploración en la V0 se enmarcaron en 14 alteraciones principales (alteración del apetito o disorexia, astenia, deshidratación, deterioro de la condición corporal, linfadenomegalia, alteración de las mucosas, polidipsia/poliuria, conjuntivitis, queratitis, lesiones orales, alteraciones digestivas, lesiones cutáneas, alteraciones respiratorias y alteraciones neurológicas) que englobaban los diferentes signos descritos para estas infecciones. La temperatura corporal no fue tomada de forma rutinaria, debido a que suponía un gran estrés para muchos gatos, lo que imposibilitaba la extracción de sangre posterior. Por ello, ni la fiebre ni su seguimiento fueron considerados durante el estudio.

Previo al estudio, y a partir de la bibliografía consultada y de la experiencia de los veterinarios participantes en el muestreo, se había establecido el valor que se daría a los signos conforme a su importancia relativa en el proceso retroviral (Apartado 3.2.5.). Al analizar los datos hay que tener en cuenta que, a diferencia de los datos laboratoriales, los signos clínicos pueden ser un tanto subjetivos y sin límites claros y precisos entre lo normal y lo alterado, e incluso apoyarse en los comentarios de los propietarios.

El cuadro clínico fue bastante variado, como se corresponde con la inespecificidad de las manifestaciones de ambas infecciones. Los gatos FeLV⁺ presentaron hasta ocho signos clínicos diferentes simultáneos y los gatos FIV⁺ hasta siete.

En los gatos FeLV⁺ los signos clínicos que aparecieron con más frecuencia fueron disorexia (33,3%), astenia (33,3%), lesiones orales (29,6%), alteraciones respiratorias (29,6%), palidez o congestión de las mucosas (25,9%) y conjuntivitis (25,9%) (Tabla 4.2.7.). Ninguno de ellos predominó sobre el resto de manera importante.

En FIV⁺ el signo que apareció más frecuentemente fue la disorexia (54,8%), seguido de la astenia (41,9%), las lesiones orales (32,3%), la palidez o congestión de mucosas (29,0%) y las alteraciones respiratorias (22,6%) (Tabla 4.2.7.).

Por tanto, el cuadro clínico fue muy similar e inespecífico en ambas retrovirusis, como se ha publicado previamente (Levy y col., 2008 y 2004; Levy y col., 2008; Hartmann, 2004, 2011 y 2012). Con el análisis de los resultados obtenidos se podría suponer que el gato FeLV⁺ o FIV⁺ “patrón” puede ser un animal decaído, con anorexia, gingivostomatitis (en los FeLV⁺), palidez en las mucosas (relacionada con la anemia, signo laboratorial que con más frecuencia aparece en los gatos infectados por este retrovirus) y/o con problemas del tracto respiratorio superior, un patrón similar al descrito por otros autores (Dunham y Graham, 2008; Hosie y col., 2009; Hartmann, 2011 y 2012).

Los gatos FeLV⁺ y FIV⁺ se subdividieron en cuatro Grupos Clínicos (Apartado 3.2.3.), dependiendo del estado clínico y los resultados del análisis biopatológico (hematología, bioquímica y proteinograma) durante la V0. Se decidió incluir en el Grupo 0 los gatos sin signos clínicos y sin ninguna alteración biopatológica. Sin embargo, este grupo no estuvo representado por ningún gato, ya que en todos los casos aparecieron alteraciones biopatológicas en alguno de los parámetros estudiados, aún en ausencia de signos clínicos. Se podría afirmar, por tanto, que la latencia clínica de los gatos FeLV⁺ y FIV⁺ no está acompañada en la mayoría de los casos de una latencia biopatológica completa. Los Grupos 1, 2, y 3 se establecieron atendiendo a la puntuación clínica, conforme al criterio: Grupo 1 con P.C. igual a 0, Grupo 2 con P.C. inferior o igual a 5 y Grupo 3 con una P.C. superior o igual a 6. Estos límites se establecieron por el grupo de investigación con el objetivo de poder realizar una comparación y seguimiento de la presencia-ausencia de signos clínicos o biopatológicos y en el caso de los Grupos 2 y 3, se estableció como P.C. límite cinco para definir un grupo con un cuadro clínico más complejo.

El Grupo 1 estaría representado por gatos en la fase de latencia de la enfermedad, en la que el virus se replica en el organismo pero no se manifiestan signos clínicos de la infección (Dunham y Graham, 2008). Los Grupos 2 y 3 estarían representados por los gatos en la fase activa de la enfermedad, en la fase inicial, en una recaída o en la fase final de la enfermedad. Los gatos se distribuyeron de forma equilibrada en los tres grupos y representaban aproximadamente un tercio de la población estudiada para cada infección (Tabla 4.2.9.).

Se observó que los gatos FeLV⁺ y FIV⁺ diferían en la distribución por edad de los tres grupos clínicos. Por un lado, en los gatos FeLV⁺ se observó que el 75% de los gatos jóvenes presentaban signos clínicos; de ellos el 83,3% pertenecían al Grupo 3. Sin embargo, en los animales de más de un año el número de gatos con signos clínicos disminuyó hasta el 52,6% (Figura 4.2.5.), un resultado similar al observado por otros autores (Arjona y col., 2000; Gleich y col., 2009). Este hecho puede explicarse por la propia patogenia y epidemiología de la enfermedad: es conocido que los gatos jóvenes son los más susceptibles a desarrollar una infección activa, y de hecho es difícil establecer una infección experimental en gatos mayores de 16 semanas (Lehmann y col., 1991; Hartmann, 2008; Levy y col., 2008; Lutz y col., 2009). Esto, unido a que la viremia inicial se produce a las pocas semanas de la infección oronasal y que puede extenderse durante varios meses, explicaría por qué el porcentaje de gatos jóvenes con signos clínicos es más elevado que el de gatos adultos, los cuales son menos susceptibles a la primoinfección. Además, se ha demostrado que la enfermedad se desarrolla en un periodo corto de tiempo, tres años, en un porcentaje elevado de animales (Cotter, 1998; Levy y col., 2006; Levy y col., 2008; Lutz y col., 2009; Hartmann, 2011 y 2012). Cabría pensar que la mayoría de los gatos adultos del presente estudio se infectaron en los primeros meses de vida y, bien se encontraban en fase de latencia, sin signos clínicos aparentes, o bien se había producido en ellos una reactivación de la infección, apareciendo de nuevo los signos clínicos.

Por otro lado, en los gatos FIV⁺ el grupo de edad más numeroso en los tres grupos clínicos fue el de tres años (Figura 4.2.5.). Al contrario de lo que ocurrió en los gatos FeLV⁺, los gatos de más edad fueron los que presentaron con mayor frecuencia signos clínicos, un 34,7% para los gatos de hasta siete años y un 83,3% de los mayores de siete años. Al igual que en los FeLV⁺, esta distribución puede explicarse a través del conocimiento de la epidemiología y la patogenia de esta infección vírica. Al contrario que en la infección por

FelV, donde disminuye la susceptibilidad de la infección con la edad, los gatos pueden infectarse por FIV a lo largo de toda su vida. Por tanto, el cuadro de viremia inicial se puede producir a cualquier edad (Natoli y col., 2005; Hartmann, 2008; Dunham y Graham, 2008). Tras la infección inicial, se ha descrito que el 50% de los gatos pueden permanecer asintomáticos durante varios años (Barr, 2000; Hosie y col., 2009; Hartmann, 2011) y esto explicaría por qué en todas las edades hay gatos con signos y sin signos clínicos. El periodo de latencia puede durar varios años, de modo que en los gatos de más edad se produce un cuadro de reactivación de los signos clínicos debido a la depresión del sistema inmunitario (Dunham y Graham, 2008; Hartmann 2011 y 2012). Por todo esto, el porcentaje de gatos con signos clínicos es mayor en los gatos con más de siete años de edad.

En ambas infecciones se observó que el porcentaje de machos con signos clínicos fue superior al de hembras y en el caso de FelV la diferencia fue significativa (machos FelV⁺ 81,8% y hembras FelV⁺ 43,7%; Tabla 4.2.10.). El número de machos dentro del grupo con signos clínicos fue mayor que el de hembras, lo que parece no coincidir con lo observado en otro estudio epidemiológico que concluyó que había mayor proporción de hembras entre los animales que presentaban signos clínicos, a pesar de que el porcentaje de machos era mayor entre los infectados (Arjona y col., 2000). Sin embargo, ambos resultados no tendrían por qué ser totalmente incompatibles, ya que podría ocurrir que los gatos machos que presentaban signos clínicos lo hicieran de forma más aguda que las hembras y la mortalidad fuera más elevada, de modo que al realizar un estudio epidemiológico de la población total el número de hembras con signos clínicos sería mayor que el de machos (Tejerizo, 2012). En el presente estudio, la P.C. media de las hembras FelV⁺ fue de 3,06 mientras que la de los machos fue de 4,00. En el caso de gatas y gatos FIV⁺ la P.C. fue más parecida (3,55 y 3,20 respectivamente), aunque hay que tener en cuenta que el propio criterio de selección eliminaba del estudio a los gatos con peor pronóstico y con cuadros clínicos muy graves, por lo que estos promedios están sesgados.

En resumen, durante la infección por FelV o FIV se observa en los gatos una gran variabilidad de signos clínicos, todos ellos inespecíficos, siendo la disorexia, la astenia, la gingivostomatitis, la palidez de mucosas y los problemas respiratorios los más frecuentes. Aunque en ambas infecciones se han descrito gatos con latencia clínica, en ningún caso se hallaron gatos sin alteraciones clínico-patológicas, por lo que no se puede hablar de una latencia completa. En ambas infecciones se ha observado que el grupo de machos tiene una mayor predisposición a presentar signos clínicos que las hembras. Por último, se ha observado que los gatos jóvenes FelV⁺ tienen mayor probabilidad de presentar signos clínicos que los adultos, mientras que en los gatos FIV⁺ son los adultos los que tienen mayor predisposición a presentar signos clínicos; esta diferencia parece ser debida tanto a la epidemiología como a la patogenia de cada una de las infecciones.

5.2.3. Situación de la analítica sanguínea de la población felina

5.2.3.1. Hemograma

La anemia es una de las principales alteraciones biopatológicas que se producen en el desarrollo de las retrovirosis felinas (Sellon y Hartmann, 2008; Dunham y Graham, 2008; Hartmann, 2008; Hartmann, 2011, 2012). De hecho, en los gatos FelV⁺ constituye el principal hallazgo laboratorial (Escolar y col., 2006; Hartmann, 2012). Por ello es imprescindible realizar una valoración inicial del hemograma para conocer el estado de salud del gato, así como para poder evaluar posteriormente su evolución con la administración de un tratamiento, como es el Roferon®.

En el análisis realizado en la V0 se observó que el 33,3% de los gatos FelV⁺ tenían alterado el hematocrito, el 29,6% la concentración de hemoglobina y el 22,2% el recuento de eritrocitos (Tabla 4.2.14.). Estos valores son muy parecidos a los descritos en otro estudio con gatos FelV⁺ en los que se obtuvo un porcentaje de alteración del hematocrito del 37% (de Mari y col., 2004).

El tipo de anemia que se observó en la mayor parte de los gatos FeLV⁺ (a excepción de FeLV-09) fue de tipo no regenerativa, es decir, normocítica, normocrómica, sin policromatofilia y con el índice de reticulocitos dentro de los valores de normalidad. La anemia no regenerativa ha sido descrita como la más frecuente (90% de los casos) en los gatos FeLV⁺ (Shelton y Linenberger, 1995; Escolar y col., 2006; Hartmann, 2012). Este tipo de anemia se puede originar por el efecto supresor del virus sobre la médula ósea, tanto de los precursores hematopoyéticos como de las células del estroma, pero también por un proceso inflamatorio o una enfermedad crónica (Hartmann, 2012).

Aunque no se puede descartar totalmente el efecto supresor de FeLV en los precursores de los eritrocitos, los resultados apuntan a que el tipo de anemia observada en los gatos FeLV⁺ se debía a una enfermedad crónica, ya que todos los gatos FeLV⁺ con anemia, excepto FeLV-10, tenían el hematocrito superior al 14% (anemia leve y moderada). En este tipo de anemia, la disminución de eritrocitos no tiene un origen único sino que en estos casos la eritropoyesis está afectada negativamente en varios puntos; por ejemplo, la supervivencia de los eritrocitos puede estar reducida, puede existir una alteración de la eritropoyesis no asociada con la deficiencia de vitamina B₁₂ o folatos (Watson y Canfield, 2010), o pueden estar implicados mediadores inflamatorios, tales como la IL-1 y la lactoferrina, que causan retención de los depósitos de hierro en el sistema mononuclear fagocitario, hepatocitos y células del epitelio intestinal (Weiss y col., 1983; Shelton y Linenberger, 1995; Dunham y Graham, 2008).

Además, la anemia por enfermedad crónica o inflamatoria estaría originada o agravada por la presencia de infecciones secundarias o por estrés. En estos casos, la eliminación del agente concomitante o la reducción del estrés puede aumentar el hematocrito incluso hasta dentro del límite de normalidad, a pesar de que FeLV siga presente (Escolar y col., 2006).

La segunda causa de anemia no regenerativa en los gatos FeLV⁺ es la aplasia medular, eritrocitaria pura o generalizada. La anemia aplásica eritrocitaria pura se ha relacionado con el subtipo C de FeLV, el cual parece bloquear la diferenciación de los precursores eritroides mediante la interferencia con los receptores de la superficie celular (Hoover y Mullins, 1991; Dunham y Graham, 2008), y cuando afecta a precursores más próximos a la célula madre se alteran un mayor número de líneas celulares hematopoyéticas, e incluso todas, provocando lo que se conoce como anemia aplásica o pancitopenia. En las anemias aplásicas el hematocrito está muy reducido (<10%). Dado que durante la V0 ninguno de los gatos presentó valores de hematocrito inferiores al 10%, *a priori* no parece ser la causa de las disminuciones del hematocrito encontradas. Sin embargo, para su diagnóstico definitivo es necesario realizar una punción medular, para observar si todos los precursores celulares (en la anemia aplásica generalizada) o sólo los eritroides (en la anemia aplásica eritrocitaria pura) están afectados. La punción medular en el gato está considerada como una técnica invasiva que el grupo de investigación decidió no realizar de forma rutinaria a los gatos incluidos en el estudio; además, era necesaria la sedación del gato para realizar esta técnica, lo que no era aceptado por todos los propietarios.

El 35,5% de los gatos FIV⁺ presentaron anemia de tipo no regenerativa, normocítica, normocrómica, sin policromatofilia y con el índice de reticulocitos dentro de los valores de normalidad (Tabla 4.2.14.). Este porcentaje de anemia se encuentra dentro del rango descrito en los gatos FIV⁺, entre el 18% y el 36% (Shelton y Linenberger, 1995; Sellon y Hartmann, 2008). En general, no existe un conjunto de alteraciones patognomónicas en la hematología de los gatos FIV⁺, pero sí que se han observado una serie de cambios hematológicos en animales infectados por este virus que se asemejan a los observados en personas HIV⁺ (Volberding y col., 2003; Sellon y Hartmann, 2008). Entre estas alteraciones se encuentra la anemia, generalmente no regenerativa (Shelton y Linenberger, 1995; Sellon y Hartmann, 2008), coincidiendo con lo observado en el presente estudio. El origen de la anemia posiblemente se debe a la replicación de FIV en las células mononucleares, que conducen a la inmunosupresión y a cambios en el sistema hematopoyético (Escolar y col., 2006; Hartmann, 2008). Por tanto, en este caso la anemia sería una consecuencia directa de la infección por FIV (Shelton y col., 1990; Sellon y Hartmann, 2008). Sin embargo, al igual que en los gatos FeLV⁺, la presencia de infecciones secundarias o de estrés puede favorecer la presentación de anemias o aumentar

su gravedad. En estos procesos inflamatorios parecen estar implicados mediadores inflamatorios que disminuyen la disponibilidad de hierro durante el curso de la hematopoyesis (Shelton y Linenberger, 1995). Al igual que ocurre en los gatos FeLV⁺ la anemia puede controlarse cuando el proceso concomitante que la provoca desaparece, a pesar de que continúe la infección por el retrovirus.

Por otro lado, en los gatos FIV⁺ se observó un mayor porcentaje de alteración del número de eritrocitos en las hembras (36,4%) que en los machos (10,0%) ($p < 0,10$) (Tabla 4.2.16.). Aunque anteriormente no se han publicado estudios sobre la influencia del sexo en la alteración del hemograma en gatos FeLV⁺ o FIV⁺, sí se ha descrito que la testosterona y los esteroides androgénicos relacionados estimulan la eritropoyesis y que los estrógenos podrían inhibirla (García, 1995), lo que explicaría esta diferencia de porcentaje de alteración entre machos y hembras. Esta influencia hormonal explicaría también porqué los gatos castrados presentaron valores de hematocrito y de concentración de hemoglobina disminuidos en un porcentaje superior al de los gatos enteros (Tabla 4.2.17.). En los gatos infectados por FeLV⁺ aunque las diferencias no fueron significativas, también se observó un mayor porcentaje de hembras enteras con el hematocrito disminuido (50,0%) que de hembras castradas (20,2%) y de machos (36,4%). Esta diferencia podría estar causada, como en FIV⁺, por la acción de las hormonas sexuales sobre la eritropoyesis.

En los gatos FeLV⁺, también se observó que los que presentaban signos clínicos (Grupos 2 y 3) tenían una mayor tendencia ($p < 0,20$) a presentar un número de eritrocitos por debajo de los índices de normalidad (31,3%) que aquellos gatos sin signos clínicos (Grupo 1) (9,1 %) (Tabla 4.2.18.). Estos signos clínicos podrían estar asociados a infecciones concomitantes, que como se ha mencionado con anterioridad agravan la anemia en enfermedades crónicas. Algunos de estos signos clínicos podrían relacionarse con la disminución de eritrocitos (decaimiento, palidez de mucosas, disorexia, etc.), lo que se vería reflejado directamente en un aumento de la puntuación clínica.

En resumen, en ambas infecciones retrovíricas los valores del hemograma están alterados frecuentemente. Con los resultados obtenidos, no se pueden establecer diferencias en la presentación de alteraciones del hemograma entre los gatos FeLV⁺ y FIV⁺. En ambos casos, el desarrollo de otras enfermedades e infecciones como consecuencia de la inmunosupresión podrían contribuir al agravamiento de la anemia producida por la acción directa del virus. En ambas infecciones, la probabilidad de presentar anemia se duplica en el caso de las hembras, hecho que podría relacionarse con el estatus hormonal.

5.2.3.2. Formula leucocitaria

Se ha descrito que en las retrovirosis felinas las poblaciones linfocíticas y neutrofílicas son las que aparecen con más frecuencia alteradas (Shelton y Linenberger, 1995; Sellon y Hartmann, 2008; Hartmann, 2008), aunque también se han descrito en FIV⁺ eosinopenias (Mandell y col., 1992).

Por este motivo, aunque se analizaron las poblaciones de eosinófilos y basófilos apenas se observaron alteraciones significativas. Esto motivó que el estudio se centrara en las poblaciones de linfocitos y neutrófilos.

5.2.3.2.1. Infección por FeLV

Se observó que aproximadamente la mitad de los gatos FeLV⁺ (48,0%) presentaron alguna alteración en la fórmula leucocitaria y un 25,9% tenía leucopenia (Tabla 4.2.21.). Los resultados obtenidos son similares a los descritos en otro estudio (de Mari y col., 2004), donde los análisis reflejaban un 41,0% de los gatos con alteración del recuento de leucocitos y un 19,0% con leucopenia.

En un 71,4% de los gatos FeLV⁺ la leucopenia se acompañaba de neutropenia. La neutropenia fue la alteración que se observó en un mayor número de animales, un 37% de los gatos; esto coincide con lo descrito por otros autores que señalan que la principal causa de leucopenia es la neutropenia y que esta última es la alteración del leucograma que se encuentra con más frecuencia (Brown y Rogers, 2001; de Mari y col., 2004; Escolar y col., 2006; Hartmann, 2011). La neutropenia se puede presentar sola o acompañada de

otras citopenias, de forma transitoria, persistente o cíclica y pueden verse afectados todos los precursores granulocíticos como consecuencia de la infección de los precursores medulares (Hartmann, 2012).

En FeLV es frecuente que el origen de las citopenias sea como consecuencia de la mielosupresión originada por una alteración a nivel medular, el síndrome de mielodisplasia o la mielofibrosis son dos ejemplos de estas alteraciones (Hartmann, 2012). Además, se ha descrito un síndrome similar al que se produce con la infección con el virus de la Panleucopenia Felina (Hartmann, 2008; Truyen y col., 2009), caracterizado por una grave leucopenia, con enteritis y destrucción del epitelio intestinal. En el presente estudio los clínicos no señalaron ningún cuadro compatible con este síndrome.

Tras la viremia inicial y la fase aguda de la infección se produce una fase de latencia que también se vería reflejada en el leucograma, correspondiendo a esta fase recuentos de leucocitos dentro de la normalidad (Hartmann, 2012). Esta normalidad se observó en el 52,0% de los gatos FeLV⁺ incluidos en nuestro estudio. El periodo de latencia revierte con posterioridad y daría lugar a un nuevo proceso neutropénico, cuya evolución dependería de la evolución de la infección (regresiva, latente o progresiva). Debido a que se desconoce el momento de la infección de los gatos estudiados, es imposible conocer qué tipo de proceso neutropénico presentaron.

Aunque en menor proporción que los procesos neutropénicos, se observaron estados de linfopenia en un 18,5 % de los gatos FeLV⁺ (Tabla 4.2.21.); esto está en línea con lo descrito por otros autores que señalan la linfopenia como una alteración común en los gatos FeLV⁺ (Dunham y Graham, 2008; Hartmann, 2012). En la primera fase de la infección, la linfopenia es transitoria y su origen parece estar en la acción directa de FeLV sobre los linfocitos (Hofmann-Lehmann y col., 1997; Hartmann, 2012). Sin embargo, en los procesos crónicos es la proteína p15E del virus la responsable del aumento de la inmunosupresión que se desarrolla, y por tanto de la disminución del número de linfocitos (Hofmann-Lemann y col., 1997; Dunham y Graham, 2008). Debido a que se desconoce el momento exacto de la infección es difícil determinar si los animales afectados se encontraban en una etapa inicial de la infección o ya en una fase de cronicidad.

En dos gatos se observaron recuentos de linfocitos por encima del límite de normalidad (linfocitosis) (Tabla 4.2.19.). En los gatos FeLV⁺ se han descrito aumentos en las poblaciones celulares de leucocitos, debido fundamentalmente a procesos linfoproliferativos o como respuesta a la infección por el propio virus o a las infecciones secundarias. Los trastornos linfoproliferativos se traducen principalmente en linfomas linfoblásticos, en los que linfocitos atípicos e inmaduros se liberan a la circulación sanguínea (Escobar y col., 2006). El diagnóstico definitivo se realiza mediante un aspirado de medula ósea, técnica que no se realizó en este estudio por su carácter invasivo; pero, es posible realizar una aproximación al diagnóstico mediante la realización de un frotis sanguíneo, para evidenciar linfocitos atípicos e inmaduros. Los dos gatos con linfocitosis (FeLV-10 y FeLV-12) presentaban una morfología normal que no hacía sospechar de un posible caso de leucemia. A este respecto es importante resaltar que un 38% de las leucemias no dan lugar a alteraciones en la morfología de las células sanguíneas, conociéndose como “leucemias aleucémicas” (Theilen y Madewell, 1987). Dos características de los gatos FeLV⁺ con linfocitosis parecen indicar que la causa más probable de la linfocitosis fuera infecciosa y no tumoral: a) ambos gatos pertenecían al Grupo 3 y, por tanto, presentaban varios signos clínicos en los que podrían estar implicados otros agentes secundarios, y b) la leucemia suele desarrollarse en los gatos FeLV⁺ con más de tres años de edad (Shelton y Linenberger, 1995), mientras que los dos gatos con linfocitosis eran menores de seis meses.

5.2.3.2.2. Infección por FIV

El 22,6% de los gatos FIV⁺ presentaron leucopenia y, al igual que en los gatos FeLV⁺, estaban producidas en la mayor parte de casos por procesos neutropénicos y/o linfopénicos (Tabla 4.2.21). Los resultados obtenidos para esta enfermedad se asemejan a los observados en individuos HIV⁺ y en gatos FIV⁺ (Volberding y Baker, 2003; Gleich y Hartmann, 2009), presentándose principalmente procesos de linfopenia y neutropenias, que son consecuencia directa del propio lentivirus (Hartmann, 2012).

La neutropenia fue la alteración más frecuente en los gatos FIV⁺, presentándose en prácticamente un tercio de los mismos (32,3%) (Tabla 4.2.21.). Este porcentaje estaría en línea con lo descrito para esta infección en otros estudios (Gleich y Hartmann, 2009; Hartmann, 2012). Se ha sugerido que en los gatos FIV⁺ la neutropenia se debe a la producción reducida o bien a la destrucción inmunomediada de los neutrófilos en la médula ósea, aunque también puede atribuirse a un secuestro de neutrófilos en un compartimento extramedular (Mandell y col., 1992). La neutropenia puede producirse inicialmente de cuatro a ocho semanas tras la infección por FIV y persistir entre dos y 18 semanas y desarrollarse tras un largo periodo de enfermedad debido al deterioro gradual del sistema inmunitario que produce este lentivirus (Hartmann, 2012). La neutropenia que presentan los gatos FIV⁺ puede favorecer o agudizar el desarrollo de infecciones secundarias y los signos clínicos asociados a ellas, como son la diarreas, la conjuntivitis, etc (Dunham y Graham, 2008; Hartmann, 2012), y de hecho, el 66,6% de los gatos con neutropenia presentaron signos clínicos.

Otra población leucocitaria afectada fueron los linfocitos. El 22,2% de los gatos FIV⁺ presentaban linfopenia (Tabla 4.2.21.). La linfopenia se relaciona directamente con la infección por FIV, ya que este lentivirus destruye los linfocitos T CD4⁺ (Hartmann, 2012). El virus puede actuar en la fase inicial de la infección provocando un descenso de los linfocitos entre las cuatro y las 20 semanas. Tras la recuperación inicial se produce una depleción gradual de los linfocitos T, persistente durante meses o años, hasta desarrollar un cuadro de inmunodeficiencia que provocará la fase de SIDA de la infección (Dunham y Graham, 2008).

En los análisis realizados se observó leucocitosis (12,9%), neutrofilia (19,3%) y linfocitosis (3,2%) (Tabla 4.2.21.). En línea con lo descrito anteriormente, en los gatos FIV⁺ pueden darse tanto procesos de inmunodeficiencia como de inmunoestimulación (Hosie y col., 2009), especialmente en las primeras fases de la infección donde hay una estimulación de tipo humoral (Dunham y Graham, 2008; Levy y col., 2008). El origen de estas citofilias también podría ser como consecuencia de la respuesta a infecciones secundarias y procesos inflamatorios, como ha sido descrito por otros autores (Dunham y Graham, 2008; Sellon y Hartmann, 2008; Hosie y col., 2009), ya que en ninguno de los casos se apreciaron alteraciones morfológicas en los frotis sanguíneos y el 83,3% de las neutrofilias se produjeron en gatos con signos clínicos (Grupos 2 y 3) (Tabla 4.2.24.). Sin embargo, no es totalmente descartable un origen tumoral, ya que aunque no se observaron alteraciones en el frotis, el diagnóstico definitivo se debe realizar a través de un aspirado de médula ósea.

Aunque los resultados porcentuales de gatos con linfopenias y neutropenias fueron similares en gatos FeLV⁺ y FIV⁺, la forma de asociarse ambas alteraciones parece mostrar cierta diferencia entre ambas infecciones. Por un lado, los gatos FeLV⁺ tuvieron una mayor tendencia ($p<0,20$) a tener ambas poblaciones celulares afectadas (linfocitos y neutrófilos) que los gatos FIV⁺ (58,3% de los gatos FeLV⁺, frente a un 21% de los FIV⁺) (Tabla 4.2.23). Esta diferencia podría residir en las células que infecta cada retrovirus. Por un lado, FeLV invade la médula ósea, pudiendo afectar a los precursores de diferentes tipos celulares (linfocitos, neutrófilos, monocitos, etc.), de modo que varias poblaciones celulares se verían afectadas en cuanto a su formación y maduración. Por otro lado, FIV afecta a células maduras y no a las células progenitoras de la médula ósea, por lo que las células infectadas serían normalmente de un solo tipo, de modo que al realizar el leucograma la mayor parte de los gatos FIV⁺ solo tendrían una de las poblaciones disminuida.

En resumen, en la infección por FeLV y FIV se producen alteraciones en el leucograma, principalmente en las poblaciones de neutrófilos y linfocitos. En ambos casos, los procesos citopénicos destacan sobre los aumentos de su población debido a la acción del virus sobre éstas células o sus precursores. En el caso de la infección por FeLV, el virus parece infectar a un precursor de la médula ósea menos diferenciado que las células maduras que infecta FIV, puesto que con más frecuencia se ven alteradas más poblaciones celulares. En ambas infecciones, la neutrofilia y linfocitosis se han relacionado con procesos infecciosos, puesto que no se observaron alteraciones en el frotis sanguíneo que hicieran pensar en un proceso tumoral.

5.2.3.3. Perfil bioquímico

Es importante realizar un análisis de los resultados obtenidos en el perfil bioquímico, ya que durante las infecciones por FeLV y FIV se han descrito como signos clínicos las insuficiencias y alteraciones renales (Levy, 2000; Hosie y col., 2009; Hartmann, 2011) y se han observado alteraciones de parámetros renales y hepáticos como la urea, la creatinina, el colesterol, y las enzimas hepáticas (Hoffmann-Lehmann, 1997; Hartmann, 2008; Sellon y Hartmann, 2008). En el presente estudio, el análisis de la bioquímica clínica se ha centrado principalmente en el estudio de los valores de urea y creatinina como indicadores de la función renal y la enzima ALT como patrón de la función hepática.

Inicialmente, se determinaron los valores de glucosa y los iones Na^+ , K^+ , y Cl^- , pero no se analizaron los resultados obtenidos debido a múltiples factores: tiempo transcurrido desde la extracción, hiperglucemia asociada a estrés, y cantidad insuficiente de muestra.

Durante la VO en ninguno de los gatos FeLV⁺ y FIV⁺ se observó una alteración significativa en los niveles de ALT. Solamente un gato FIV⁺ presentó la ALT por encima de los valores de normalidad. En los gatos se pueden producir cuadros de ictericia e inflamación y degeneración hepática, generalmente debido al desarrollo de lipidosis hepática, como consecuencia de estados de decaimiento y anorexia prolongados (Reinacher y col., 1995). En los gatos FeLV⁺ también se han descrito procesos de necrosis focal hepática (Hartmann, 2008) y en gatos FIV⁺ hepatitis periportal (Sellon y Hartmann, 2008). El bajo número de casos en los que se observaron alteraciones en la ALT podría ser debido al criterio de selección establecido; los gatos con neoplasias o en estado crítico no fueron incluidos, siendo estos gatos los más predispuestos a desarrollar lipidosis hepática, y por tanto, alteraciones plasmáticas de la enzima ALT.

Antes de discutir los resultados de los parámetros renales es importante tener en cuenta que la observación de una alteración en la concentración de urea y creatinina plasmática es sólo un indicio de alteración renal. Para llegar a un diagnóstico definitivo sería necesario realizar otras pruebas como la concentración de fósforo sanguíneo, proteínas, cociente proteína:creatinina en orina y microalbuminuria, análisis biopatológicos, etc. Todas estas pruebas no fueron incluidas en el protocolo, por tanto no pudo ser analizado más profundamente.

En la VO se observó que un 22,6% de los gatos FIV⁺ presentaron alteraciones en los niveles de urea, acompañados de elevados niveles de creatinina en dos gatos. Estas alteraciones podrían tener su origen en un descenso de la filtración glomerular como consecuencia de una disfunción renal (Hofmann-Lehmann y col., 1997). Anteriormente, en los gatos FIV⁺ se había descrito la presencia de engrosamiento mesangial, glomeruloesclerosis, glomerulonefritis y depósitos de sustancia amiloide a nivel glomerular (Poli y col., 1995a y b).

Todos los gatos FIV⁺ con alteración en los valores renales presentaron hipergammaglobulinemia. Además, se observó una correlación positiva moderada entre los valores de urea y las gammaglobulinas. Esto estaría en consonancia con lo descrito por otros autores que señalan que la formación de inmunocomplejos, con partículas víricas y proteínas víricas, y su depósito en los riñones da lugar a una glomerulonefritis que altera la filtración glomerular y los parámetros bioquímicos renales (Poli y col., 1995a y b; Matsumoto y col., 1997; Hosie y col., 2009; Hartmann, 2011, 2012).

Todos los gatos FIV⁺, excepto uno, con la concentración de urea aumentada presentaban signos clínicos. Este resultado parece indicar que los gatos con un cuadro clínico más grave tienen una mayor probabilidad de presentar alteraciones a nivel renal y desencadenar así el cuadro clínico asociado.

Los resultados del estudio también muestran que el 72,0% de los gatos FIV⁺ con hipergammaglobulinemia no presentaban niveles alterados de urea, por lo que se puede afirmar que la hipergammaglobulinemia es quizás un elemento predisponente de lesión renal pero no único o suficiente en todos los casos, o que es necesario que la hipergammaglobulinemia se prolongue durante un periodo mayor de tiempo para desarrollar enfermedad renal.

En un 18,5% de los gatos FeLV⁺ se observaron alteraciones en los niveles de urea, en consonancia con lo descrito por otros autores que han relacionado este virus con el desarrollo de glomerulonefritis inmunomediadas (Hofmann-Lehmann y col., 1997; Lutz y col., 2009; Hartmann, 2008, 2012). Al igual que en los gatos FIV⁺, los altos niveles de urea se acompañaron de hipergammaglobulinemia en todos los casos, excepto en uno. Estas gammaglobulinas podrían dar lugar al depósito de inmunocomplejos a nivel del glomérulo renal, hecho que otros autores han señalado como parte del origen de esta glomerulonefritis en los gatos FeLV⁺ (Hofmann-Lehmann y col., 1997; Hartmann, 2011, 2012).

Otras causas que podrían inducir estas alteraciones renales son las infecciones urinarias de etiología bacteriana (Fleming y col., 1991), lo que se comprobaría con un urocultivo. Las alteraciones a nivel del tracto urinario inferior han sido descritas en los gatos FIV⁺ (Levy y col., 2008; Hartmann, 2011), estas alteraciones podrían predisponer a infecciones secundarias y dar origen a alteraciones renales como consecuencia del desarrollo de las mismas. En el presente estudio no se llevó a cabo esta técnica, ya que para hacer un análisis microbiológico correcto es necesario extraer orina por cistopunción bajo ecografía guiada, lo cual como ya se ha explicado anteriormente no estaba incluido en el protocolo de los gatos estudiados.

Debe tenerse en cuenta que la aparición de signos clínicos urinarios en los gatos FeLV⁺ puede no estar relacionado con una alteración a nivel renal, ya que se ha descrito la aparición de incontinencia urinaria causada por neuropatías (Carmichael y col., 2002).

5.2.3.4. Análisis y electroforesis de las proteínas plasmáticas (proteinograma)

El proteinograma es una de las pruebas biopatológicas más utilizadas en los procesos infecciosos en veterinaria, tanto en el diagnóstico, como en el seguimiento de los mismos (Miró y col., 2007). En este estudio se decidió analizar el perfil proteico plasmático al comprobar que la concentración de proteínas plasmáticas totales estaba aumentada en varios gatos.

El análisis del proteinograma evidenció un 29,6% de gatos FeLV⁺ y un 51,6% de FIV⁺ con hiperproteinemia y el 40,7% de los gatos FeLV⁺ y el 80,6% de los FIV⁺ con hipergammaglobulinemia policlonal (Tabla 4.2.27.). En todos los gatos FeLV⁺ y FIV⁺ esta hiperproteinemia se acompañaba de hipergammaglobulinemia, de modo que, como se ha descrito anteriormente, la hipergammaglobulinemia es una de las causas principales de la hiperproteinemia en FIV (Hofmann-Lehmann y col., 1997; Sellon y Hartmann, 2008). Sin embargo, el 18,2% de las hipergammaglobulinemias en FeLV⁺ y el 36,0% en FIV⁺ no dieron lugar a hiperproteinemias, debido a que los incrementos de gammaglobulinas no eran lo suficientemente elevados como para alterar el valor de las proteínas totales.

Se ha descrito que en los gatos infectados por FeLV puede producirse una sobreactivación y desregulación de la respuesta inmunitaria frente al virus, la respuesta humoral específica decrece y se incrementa la formación de inmunoglobulinas G y M inespecíficas (Hartmann y col., 2011). Los datos del estudio muestran que los gatos FeLV⁺ presentaban un menor porcentaje de hipergammaglobulinemia que los FIV⁺, coincidiendo con los resultados de estudios anteriores (Miró y col., 2007; Gleich y Hartmann, 2009). El origen de esta alteración en los gatos FeLV⁺ no parece tener relación directa con el retrovirus implicado, sino que podría estar relacionado con las infecciones secundarias, ya que hubo diferencias estadísticamente significativas entre los gatos con y sin signos clínicos (Tabla 4.2.28.). Esto apoyaría los resultados anteriores donde se ha

descrito que en los gatos SPF no se producen alteraciones en las gammaglobulinas (Hofmann-Lehmann y col., 1997). Por otro lado, en algunos estudios se ha observado que en los gatos infectados por FeLV se produce un cuadro de inmunodeficiencia en fases terminales de la enfermedad que se caracteriza por hipogammaglobulinemia (Lutz y col., 2009). Este resultado no es discordante con el obtenido en el presente estudio, ya que se excluyeron los gatos con estados clínicos muy graves.

Por otra parte, la hipergammaglobulinemia policlonal más o menos marcada que se observó en el 80,6% de los gatos FIV⁺ (Tabla 4.2.27.) fue similar a la previamente descrita en gatos infectados por este virus (Flynn y col., 1994; Hofmann-Lehmann y col., 1997; Gómez y col., 2006; Gleich y Hartmann, 2009, 2011; Hosie y col., 2009). El origen de esta alteración podría deberse a la reacción inmunitaria frente a las infecciones secundarias y una respuesta inespecífica durante la infección por FIV como se ha señalado por otros autores (Levy y col., 2008). Sin embargo, estudios realizados por otros autores han demostrado la presencia de esta alteración en gatos SPF sin contacto con ningún otro patógeno (Poli y col., 1992a y b; Bendinelli y col., 1995; Hartmann, 2011). Por tanto, aunque la presencia de infecciones secundarias puede aumentar la cantidad de gammaglobulinas, el origen de la hipergammaglobulinemia está ligado a la propia infección por FIV.

En la infección por el HIV el aumento de gammaglobulinas refleja una hiperactivación aberrante de los linfocitos B (Hartmann, 2008). Esto se ha observado también en la infección por FIV (Ackley y col., 1990), dando lugar a anticuerpos frente a antígenos víricos y no víricos (Flynn y col., 1994) o frente a antígenos con los que el individuo ha contactado previamente, siendo incapaz de formar anticuerpos en respuesta a la entrada de antígenos nuevos (Gómez y col., 2006). Con el análisis realizado en este estudio no se puede conocer frente a qué antígeno iban dirigidos estos anticuerpos, ya que sería necesario realizar un análisis más específico de las gammaglobulinas. Tras 56 meses de infección se ha descrito una reducción de la hipergammaglobulinemia como resultado de la inmunosupresión (Hofmann-Lehmann y col., 1997). Sin embargo, en el presente estudio no se observaron diferencias significativas con respecto a la edad, quizás porque se desconoce el momento de infección, y porque los gatos en fase terminal, en los que se produce una mayor disminución de las gammaglobulinas, fueron excluidos del estudio.

Debido al aumento de las gammaglobulinas se produjo una disminución del cociente A/G en el 25,9% de los gatos FeLV⁺ y en el 38,7% de los FIV⁺ (Tabla 4.2.27.). La alteración del cociente A/G y la hipergammaglobulinemia son dos parámetros complementarios: el primero expresa la cantidad y el segundo la proporción y tipo de globulinas séricas alteradas. El cociente A/G es un parámetro utilizado en el seguimiento de algunas enfermedades infecciosas en veterinaria tanto en el perro (ej. leishmaniosis, ehrlichiosis) como en el gato (infecciones por coronavirus felino) (Miró y col., 2006). En el presente estudio se observaron diferencias significativas en el cociente A/G y en la cantidad de gammaglobulinas entre los gatos FeLV⁺ que presentaron signos clínicos y los que no los presentaron. Por lo tanto, ambos parámetros podrían utilizarse como método evaluador del estado clínico de los gatos FeLV⁺. Sin embargo, en los gatos FIV⁺ no se observaron diferencias en el cociente A/G ni en la cantidad de gammaglobulinas entre los gatos con y sin signos clínicos; este resultado está en consonancia con lo descrito anteriormente por Ackley y col., (1990).

En el 6,4% de los gatos FIV⁺ se observó una elevación de las alfa globulinas (Tabla 4.2.26.). Esta alteración ha sido descrita previamente por otros autores (Duthie y col., 1997; Correa y col., 2001; Gómez y col., 2006). Entre las alfa globulinas se encuentran las proteínas de fase aguda (APPs, del inglés, *acute phase proteins*), que se incrementan como respuesta rápida frente a enfermedades infecciosas, neoplásicas o en procesos traumáticos (Duthie y col., 1997; Pocacqua y col., 2005). Se podría pensar que los gatos que presentaron el valor de las alfa globulinas elevado se infectaron poco tiempo antes de incluirse en el estudio y que se encontraban en una fase inicial de la infección; sin embargo, el aumento de alfa globulinas no sólo se produce en la fase aguda sino también en la reagudización de la infección por FIV (Gómez y col., 2006). Por ello, no se puede utilizar el valor de estas proteínas como marcador de fases tempranas de la infección. Además, se ha descrito la necesidad de calcular las APPs de forma directa y no a partir de las alfa globulinas, ya que se ha demostrado la no existencia de una correlación entre ambos parámetros (Gómez y col., 2006; Leal y col., 2014).

En los gatos FeLV⁺ también se observó un incremento de estas alfaproteínas en un 7,4% de los gatos. Hasta este momento, salvo el estudio realizado por nuestro equipo (Miró y col., 2006), no se han publicado trabajos en los que se describa o descarte la existencia de alteración de esta fracción proteica durante la infección por FeLV. El origen de este aumento podría estar en la respuesta inmunitaria frente al propio virus, como se ha descrito anteriormente en la infección por FIV; o como respuesta a las infecciones secundarias, de forma similar a lo que ocurre con las gammaglobulinas en los gatos FeLV⁺. El hecho de que todos los casos de hiperalfaglobulinemia estuvieran asociados a hipergammaglobulinemia parece mostrar que las infecciones secundarias tienen un papel importante en el aumento de las alfaglobulinas. El incremento de las alfaproteínas en gatos se ha relacionado con la aparición de linfomas (Correa y col., 2001); sin embargo, como se ha mencionado anteriormente, no se han hallado indicios de la presencia de neoplasias sanguíneas, por lo que ésta no parece ser la causa de la alfaglobulinemia observada.

Se observó que los gatos adultos FeLV⁺ presentaban un mayor porcentaje de hiperproteinemia e hipergammaglobulinemia que los gatos jóvenes (Tabla 4.2.29.), lo que podría ser debido a una mayor incidencia de infecciones secundarias, y a una menor estimulación antigénica o a un sistema inmaduro en los gatos jóvenes.

Por último, solamente se observó hipoalbuminemia en un gato FeLV⁺ y en uno FIV⁺ (Tabla 4.2.25. y 4.2.26.). Un estudio previo realizado por nuestro equipo de investigación ya señaló que en ambas infecciones la concentración de albúmina en los gatos infectados por ambos retrovirus se encontraban dentro de la normalidad (Miró y col., 2006). La disminución de la concentración de albúmina plasmática podría ser debida a una menor absorción de proteínas debida a periodos de disorexia y anorexia, a una alteración hepática que disminuya la síntesis de albúmina o a una lesión renal que aumente su excreción.

En resumen, en ambas infecciones se han observado incrementos de concentración en el plasma de dos fracciones proteicas: las alfaglobulinas y las gammaglobulinas. Estas alteraciones provocaban, en algunos casos, un cuadro de hiperproteinemia y alteración del cociente A/G. Por el contrario, no se observaron variaciones en la concentración de albúmina en ambas infecciones víricas. En la infección por FeLV las alteraciones del proteinograma parecen estar relacionadas con las infecciones secundarias, ya que se observaron fundamentalmente en los animales con signos clínicos, mientras que en la infección por FIV parece tener una relación directa con la infección vírica, ya que no se observaron diferencias significativas entre los gatos con o sin signos clínicos. Cabe destacar, la marcada hipergammaglobulinemia observada en los gatos FIV⁺.

5.2.3.5. Cociente de poblaciones CD4⁺/CD8⁺

El 69,2% de los gatos FIV⁺ presentaban una disminución del cociente CD4⁺/CD8⁺ por debajo del valor normal establecido (0,9), siendo la media de dicho cociente de 0,80 (Tabla 4.2.32.). Se ha descrito que la anormalidad inmunológica más importante en las infecciones por FIV es la disminución en el número y la proporción relativa de linfocitos T CD4⁺ en la sangre periférica y en los tejidos linfoides primarios que conduce a la inversión de la relación CD4⁺/CD8⁺ (Tompkins y col., 2002; Bull y col., 2003; Paillot y col., 2005; Dunham y Graham, 2008; Levy y col., 2008; Hosie y col., 2009; Hartmann, 2012). Paralelamente, también se ha observado un incremento de los linfocitos T CD8⁺ lo que desequilibra en mayor medida el cociente CD4⁺/CD8⁺ (Shimojima y col., 2003; Phadke y col., 2006; Levy y col., 2008; Hartmann, 2012). La disminución de los linfocitos T CD4⁺ puede deberse a una reducción de producción como consecuencia de la infección de la médula ósea o del timo, por la lisis de las células infectadas por FIV (efecto citopático), la destrucción de las células infectadas con el virus por el sistema inmunitario o la muerte por apoptosis (Tompkins y col., 2002; Mizuno y col., 2003; Dunham y Graham, 2008; Hartmann, 2012). Se ha demostrado que las proteínas Env en FIV son capaces de inducir apoptosis en las células mononucleares por un mecanismo que requiere de unión a CXCR4 (Garg y col., 2009). El grado de apoptosis se correlaciona inversamente con el número de linfocitos T CD4⁺ y la relación CD4⁺/CD8⁺ (Holznagel y col., 1998; Hartmann, 2012). La pérdida de linfocitos T CD4⁺ perjudica la respuesta inmunitaria, debido a su papel en la promoción y mantenimiento de la inmunidad

humoral y de la mediada por células (Hartmann, 2012), aunque la inmunidad celular sería la más afectada (Levy y col., 2008). Aunque en el presente estudio no se analizó, existe un cierto conjunto de linfocitos T CD4⁺, los linfocitos T-reguladores, con actividad inmunosupresora que han sido documentadas durante la infección por FIV (Mexas y col., 2008; Petty y col., 2008).

Además se observó que los gatos FIV⁺ con signos clínicos presentaban un porcentaje de alteración del cociente CD4⁺/CD8⁺ mayor que aquéllos que no los presentaban (77,8% y 50,0%, respectivamente), siendo la media del cociente también significativamente mayor en los gatos sin signos clínicos (0,92) que en aquellos con signos (0,75) (Tabla 4.2.33.). Esta diferencia parece mostrar que existe cierta relación entre el empeoramiento del estado inmunitario, que se ha asociado con la alteración del cociente CD4⁺/CD8⁺, y la aparición de signos clínicos, algunos de ellos debidos a las infecciones secundarias y oportunistas que se producen por estos estados de inmunodepresión tal y como se ha descrito por otros autores (Levy y col., 2008).

Por último, el porcentaje de gatos FeLV⁺ con alteración del cociente CD4⁺/CD8⁺ (26,1%) fue menor que en los gatos FIV⁺ y la media del cociente (1,66) fue mayor que en los gatos FIV⁺, encontrándose en este caso entre los límites de normalidad (Tabla 4.2.32.). Se ha descrito anteriormente que algunos gatos durante la infección por FeLV pierden linfocitos T CD4⁺ (Lutz y col., 2009), pero se ha considerado que es más frecuente que tanto la población CD4⁺ como la CD8⁺ se reduzca (Hoffmann-Fezer y col., 1996; Hartmann 2011, 2012), motivo por el cual se observarían menores alteraciones en el cociente CD4⁺/CD8⁺.

No se ha descrito que, en general, FeLV induzca apoptosis de los linfocitos T CD4⁺, aunque sí algunas variantes de FeLV-C y por tanto alterar el cociente CD4⁺/CD8⁺ (Hoffmann-Fezer y col., 1996).

En cuanto a los Grupos Clínicos, se observó que la mitad de los gatos que presentaban el cociente CD4⁺/CD8⁺ disminuido pertenecían al Grupo 3 y que la media variaba entre ellos, reduciéndose el cociente al aumentar los signos clínicos (GC1 - 1,91, GC2 - 1,69, GC3 - 1,22) (Tabla 4.2.33.). Esto parece indicar que, al igual que en la infección por FIV, los procesos de inmunodepresión que se asocian a la disminución del cociente CD4⁺/CD8⁺ favorecen la aparición de infecciones secundarias y de los signos clínicos que se pueden asociar a éstas.

En resumen, en ambas infecciones retrovíricas se observó la alteración del cociente CD4⁺/CD8⁺, especialmente en los gatos FIV⁺. El cociente estuvo más alterado en los gatos que presentaron signos clínicos en ambas infecciones con respecto a los que no presentaban signos clínicos.

5.2.3.6. Serie plaquetar

En los gatos FeLV⁺ y FIV⁺ se han descrito anomalías plaquetarias. En los gatos FeLV⁺ se han descrito procesos de trombocitosis transitoria, macrocitosis y trombocitopenia inmunomediada y por procesos de inmunosupresión; en los gatos FIV⁺ destacan las trombocitopenias (Escolar y col., 2006; Gleich y Hartmann, 2009; Lutz y col., 2009; Hartmann, 2012). Inicialmente, se planteó realizar un análisis de las plaquetas. Debido al tiempo que transcurría desde la extracción hasta el análisis de la muestra, superior a 24 horas en la mayoría de los casos, los resultados que se obtenían no eran válidos, motivo por el cual se descartó su análisis.

5.2.4. Situación de la infección vírica de la población felina

5.2.4.1. Proteínas víricas p24 y p27

La concentración de p27 en el plasma de los gatos FeLV⁺ permite su detección por métodos de inmunocromatografía o ELISA y se utiliza de este modo para el diagnóstico de la enfermedad (Dunham y Graham, 2008; Levy y col., 2008; Lutz y col., 2009; Willett y Hosie, 2013), como en el caso del presente estudio donde se utilizaba como criterio de selección. No se observaron diferencias significativas entre los animales de los diferentes grupos clínicos. Esto está en consonancia por lo descrito anteriormente, ya que la

concentración de esta proteína en el plasma, no sólo está asociada a partículas víricas sino también está presente de forma libre, por lo que no siempre su concentración es proporcional al grado de viremia y el estado clínico del animal (Dunham y Graham, 2008). Podría existir una discordancia entre la detección del virus, con resultado positivo, y la proteína p27, con resultado negativo, que se ha relacionado con la recuperación temprana de la enfermedad o regresión de la infección (Dunham y Graham, 2008; Levy y col., 2008; Hartmann, 2012) y que en raras ocasiones es atribuible a un secuestro de la infección por FeLV (Dunham y Graham, 2008).

Los gatos del presente estudio, en cambio, se encontrarían en una evolución progresiva de FeLV, ya que en todos los casos se detectó la proteína p27 y provirus en sangre circulante. Esto estaría en consonancia con lo descrito por otros autores (Hartmann, 2012).

En el caso de los gatos FIV⁺ no se detectó la proteína p24 en ninguno de los gatos incluidos en el estudio, lo que está en línea con lo descrito por otros autores que señalan que la concentración plasmática de dicha proteína y del virus son inferiores a los límites de detección de las técnicas desarrolladas hasta el momento (Levy y col., 2008; Gómez-Lucía y col., 2006; Collado y col., 2012). Esto confirmaría que la detección y el seguimiento de la infección de la proteína p24 podrían no ser útiles en los gatos infectados por FIV. Por el contrario, los test diagnósticos más extendidos se basan en la detección de anticuerpos frente a esta proteína, y la proteína transmembrana, debido a que existe una seroconversión muy rápida cuando se produce la infección (Levy y col., 2008; Hosie y col., 2009). Por eso, en el presente estudio se usó como criterio de inclusión de gatos FIV⁺ la detección de anticuerpos frente a la proteína p24 del virus en el plasma de los animales.

5.2.4.2. Actividad retrotranscriptasa (RT)

Como se ha señalado en el apartado anterior, tras la virogénesis de FeLV se produce la liberación en la circulación sanguínea de proteínas víricas como la proteína p27, que sin embargo no siempre se asocia a partículas infectivas (Jarrett, 1999; Dunham y Graham, 2008). Solamente aquellas partículas que poseen actividad RT serán capaces de completar el ciclo vírico en nuevas células, ya que esta enzima permite la conversión del ARN viral en ADN capaz de integrarse en el genoma celular (Willet y Hosie, 2013). Por ello, la cuantificación de la actividad RT permite conocer indirectamente el número de partículas víricas infectivas (Tejerizo y col., 2005).

En ninguno de los plasmas de los gatos FIV⁺ se detectó actividad RT, como ocurrió con la proteína p24. Esto puede explicarse por la escasa cantidad de virus circulante o por una escasa sensibilidad de la técnica. Por ello, como ocurría con la p24, podría no ser útil considerar la actividad RT como uno de los parámetros a evaluar durante el seguimiento de la infección por FIV.

En cambio, en el plasma del 71,0% de los gatos FeLV⁺ sí se detectó actividad RT. El porcentaje de detección fue significativamente diferente entre los grupos clínicos ($p < 0,05$), con el mayor porcentaje de gatos con resultado positivos a actividad RT en el Grupo 3 (100%), seguido del Grupo 2 (75,0%), y en menor porcentaje en el Grupo 1 (45,0%) (Tabla 4.2.35.). Esto parece indicar una correlación entre la presencia de virus infectivo circulante y el aumento de los signos clínicos, de modo que es más probable detectar actividad RT en los gatos con cuadros clínicos más graves que en aquellos que no presentan signos clínicos. Sin embargo, también puede ocurrir que el debilitamiento del sistema inmunitario del gato (disminución del cociente CD4⁺/CD8⁺) favoreciera, por un lado una mayor replicación y liberación del virus, y por otro la aparición de signos clínicos.

En los gatos FeLV⁺ no se observó correlación entre la actividad RT y el recuento total de leucocitos, neutrófilos o linfocitos. Esto parece indicar que la presencia de partículas víricas infectivas en el plasma de los gatos infectados no induce efecto directo sobre las poblaciones de células blancas, por lo que su alteración debe ser debida a otros mecanismos.

5.2.4.3. Carga provírica

Se confirmó el resultado positivo del ELISA frente a la proteína p27 de FeLV y frente a los anticuerpos anti-p24 de FIV mediante PCR anidada y qPCR. En todos los casos se obtuvo un resultado positivo. Estos resultados confirmarían que la infección del virus finalmente se ha producido y es progresiva (Hartmann, 2012).

En ocasiones existe un resultado discordante entre los resultados de los test de detección de proteínas víricas y la detección de provirus en sangre circulante: En las infecciones regresivas o latentes (Lutz y col., 2009) existe un bajo o moderado título provírico por una antigenemia transitoria que no es detectable mediante técnicas ELISA (Hofmann-Lehmann y col., 2008; Hartmann, 2012; Willet y Hosie, 2013). Además, algunos autores han definido como infección latente aquella en la que existe una ausencia de virus circulante en la sangre pero el virus está presente y puede reactivarse en la médula ósea (Hofmann-Lehmann y col., 2008; Willet y Hosie, 2013). No obstante, este no fue el caso del presente estudio, puesto que existía antigenemia evidente, y el virus circulaba al poder ser detectado mediante PCR de células sanguíneas.

En los gatos FeLV⁺ se observó que la carga provírica presentaba una correlación positiva moderada con la concentración de proteína p27 y la actividad RT (ambos parámetros víricos), y negativa con el cociente CD4⁺/CD8⁺ (parámetro inmunológico) (Figura 4.2.10.). Esto parece mostrar que la concentración de proteína p27, la actividad RT y el cociente CD4⁺/CD8⁺ serían tres parámetros importantes en el seguimiento de infección ya que indicarían de manera indirecta y aproximada si la carga provírica aumenta o disminuye durante la infección o después de un tratamiento, lo que a su vez, podría relacionarse con una evolución favorable o no de la infección.

Por el contrario, en los gatos FIV⁺ no se encontró una correlación entre la carga provírica y el cociente CD4⁺/CD8⁺ posiblemente porque no se han incluido en el estudio animales con cuadros clínicos muy avanzados o en fase de SIDA donde hay un descenso marcado de este cociente.

En resumen, en el caso de FIV los parámetros virológicos no parecen resultar de utilidad para evaluar la situación clínica y evaluación de la enfermedad, debido a que o no se detectan con las técnicas empleadas rutinariamente o su resultado no es significativo con la situación clínica. En el caso de FeLV, solo en la actividad RT se ha observado una diferencia significativa entre los animales que tenían signos clínicos y los asintomáticos. Sin embargo, si que se ha observado una correlación positiva entre la concentración de p27, la actividad RT y la carga provírica y negativa entre la carga provírica y el cociente CD4/CD8, por lo que no se debe descartar que estos parámetros víricos puedan resultar de utilidad en el seguimiento de la infección.

5.3. Seguimiento y evolución de la respuesta al tratamiento de los gatos tratados con Roferon®.

A día de hoy, se han publicado muy pocos artículos en los que se evalúe la eficacia del IFN- α en el tratamiento de las retrovirus felinas (Hoover y col., 1991; Zeidner y col., 1990; Riondato y col., 2003; Pedretti y col., 2006). Hace algunos años se comenzó a utilizar el rHuIFN- α en los gatos infectados por FeLV y FIV tras el buen resultado obtenido en el tratamiento de HIV y en la Hepatitis vírica humana C (Plettenberg y col., 1990; Lidman y col., 1993; Zhao y col., 2008), y por la inexistencia de una molécula similar de origen felino. Además, no se debe olvidar que hasta el momento no existe un tratamiento específico para estas infecciones, y que la inmunoterapia es una de las posibles vías para evitar el desarrollo o el progreso de ambas enfermedades. Años más tarde se comenzó a sintetizar y comercializar el rFeIFN- ω (Virbagen®), y la aparición de esta nueva molécula en el mercado desplazó en gran medida la aplicación en medicina veterinaria del interferón recombinante humano.

Con el presente estudio se pretende recobrar esta línea de trabajo, ya que como se mencionó anteriormente no existen muchas alternativas terapéuticas para los gatos infectados con estos retrovirus y los resultados empíricos han mostrado que este tratamiento puede contribuir a controlar el desarrollo de la infección. Además, debe tenerse en cuenta que la administración oral junto con el alimento facilita la continuidad del tratamiento, ya que en muchos casos otras vías suponen un estrés importante para el gato, y con el tiempo el animal rechaza la administración, llegando a ser muy complicada o incluso imposible. Por último, las bajas concentraciones que se utilizan reducen de forma significativa su coste, especialmente importante si tenemos en cuenta que se trata de una enfermedad crónica que puede requerir repetir de forma continuada el tratamiento.

No se incluyó en este estudio un grupo control con animales no tratados, ya que el grupo investigador consideró que, ante la falta de alternativas terapéuticas, era necesario dar una respuesta a los propietarios que acudían con su gato enfermo. Por lo tanto, se decidió que la evolución se evaluara por comparación con la situación antes de iniciar el tratamiento (V0). Además, al tratarse de animales con infección natural en diferentes momentos y, por tanto, en diferentes estados de la enfermedad, imposibilitaría una comparación real de dos grupos de animales de los cuales se desconocía su fase de la infección. Otros autores han realizado estudios similares en gatos con infección natural por FeLV o FIV, sin grupo control tratado con un placebo, considerando los resultados del día cero de cada gato como el mejor control para el seguimiento del tratamiento con interferón en cada animal (Gil y col., 2013; Leal y col., 2013 y 2015).

5.3.1. Seguimiento de la exploración y valoración clínica de la población incluida en el ensayo con Roferon®

Tras el tratamiento con Roferon® se observó un porcentaje de mortalidad relativamente bajo en ambas infecciones víricas (7,4% en los gatos FeLV⁺ y 3,2% en los FIV⁺). En otros estudios empleando esta molécula se ha observado una mortalidad del 59% en los gatos FeLV⁺ no tratados y del 47% en los gatos FeLV⁺ tratados con rFeIFN- ω (de Mari y col., 2004), y del 100% en los FIV⁺ no tratados y del 9,1% en los FIV⁺ tratados con rHuIFN- α (2a) (Pedretti y col., 2006).

Aunque se haya observado en el presente estudio una baja mortalidad con el tratamiento con Roferon®, es muy difícil llegar a una conclusión definitiva debido a dos motivos: la ausencia de un grupo control y a que se trata de dos infecciones de carácter crónico, con una supervivencia de varios años en ambos casos. En cualquier caso, no se puede descartar un aumento del porcentaje de supervivencia de los gatos tratados con Roferon®, como ya se ha descrito en otros estudios anteriores (Cummins y col., 1988; Weiss y col., 1991; Pedretti y col., 2006).

Los dos gatos FeLV⁺ que murieron en la V2 (FeLV-01 y FeLV-10) pertenecían al Grupo Clínico 3 y su puntuación clínica no había mejorado en la V1 (Tabla 4.3.1.). Esto podría indicar que la eficacia del Roferon®, en lo que a supervivencia se refiere, se reduce cuando los animales presentan un cuadro clínico más grave. Por tanto, la ausencia de mejoría clínica en la V1 se podría relacionar con un pronóstico desfavorable de la infección por FeLV. Por otro lado, el gato FIV-14 que falleció durante el estudio lo hizo entre la V2 y la V3 (Tabla 4.3.2.) tras una leve mejoría clínica transitoria.

Con respecto a la evolución de la puntuación clínica, se observó que tanto en los gatos FeLV⁺ como en los FIV⁺ se produjo una mejoría del estado clínico, aunque la respuesta fue algo distinta en ambas enfermedades.

En los gatos FeLV⁺, la visita en la que los resultados fueron más favorables fue la V3 ya que: a) todos los gatos que fueron explorados presentaron una mejoría en su P.C. con respecto a V0 (Tabla 4.3.3.), b) los valores medios de la P.C. global (0,25) y la de los gatos con signos clínicos (1,50) fueron los más bajos de las tres visitas (Tablas 4.3.4. y 4.3.5.), y c) el porcentaje de reducción con respecto a V0 fue el mayor de las tres visitas realizadas tras iniciar el tratamiento (Tablas 4.3.4. y 4.3.5.). Sin embargo, es importante señalar que esta puntuación clínica está algo sesgada, ya que de los ocho gatos con mayor P.C. (Grupo 3), solamente dos fueron llevados a consulta por sus dueños en la V3 (Tabla 4.3.1.).

En cambio, en los gatos FIV⁺ la V2 fue la visita en la que se obtuvieron los resultados más favorables al tratamiento con Roferon® ya que: a) el 100% de los gatos explorados presentaron una mejoría en su P.C. con respecto a V0 (Tabla 4.3.3.), b) el valor medio de la P.C. global fue el más bajo de las tres visitas (0,77) (Tabla 4.3.4.), y c) el porcentaje de reducción con respecto a V0 fue el mayor de las tres visitas realizadas (Tabla 4.3.5.). En la V3 los resultados de los valores medios de la puntuación clínica se mantuvieron similares a los obtenidos en la V2. Pedretti y col. (2006) describieron una disminución rápida y persistente de los signos clínicos en los gatos FIV⁺ tratados con Roferon®, similar a la observada en el presente estudio. Aunque en la V3 se observó un porcentaje de gatos importante que mejoraron su situación clínica con respecto a V0, este fue menor que el observado en la V2 (87,5% en la V3 frente al 100% en la V2) (Tabla 4.3.3.). Se produjo un aumento de la P.C. en el periodo entre V2 y V3 en dos gatos FIV⁺ (FIV-22 y -30), y un gato murió entre estas dos visitas a pesar de haber tenido una mejoría previa (Tabla 4.3.2.). Estos resultados negativos parecen indicar que, a pesar de que se observa una respuesta favorable en lo que se refiere a los signos clínicos, tras dejar de administrarlo (V2) se puede producir una disminución de la eficacia clínica, lo que se ha descrito en el presente estudio como “efecto rebote”.

En resumen, los gatos FeLV⁺ parecieron tener una respuesta más lenta y más duradera al Roferon® que los gatos FIV⁺, ya que estos últimos presentaron una mejoría clínica muy rápida al iniciar el tratamiento, pero ésta empeoró también con más rapidez tras dejar de administrarlo. A pesar de esta diferencia, en ambas infecciones, se observó que el estado clínico de los gatos mejoró con la administración de Roferon®, y que en la mayoría de los casos, esta mejoría se mantenía cierto tiempo a pesar de no administrarse el tratamiento.

En ambas infecciones los signos clínicos, y principalmente aquéllos que se presentaron con más frecuencia (alteraciones del apetito, astenia, deterioro del estado corporal, lesiones orales o alteraciones respiratorias), se redujeron gradualmente tras la administración del Roferon® (Tabla 4.3.6.). Anteriormente, ya se había descrito en los gatos FIV⁺ la disminución de las linfadenopatías, las lesiones cutáneas, oculares y orales, y el incremento del apetito en los gatos tratados con rHuIFN- α (2a) (Pedretti y col., 2006). De hecho, se ha descrito que el interferón puede incrementar el apetito por un mecanismo similar al de las endorfinas en el sistema nervioso central (Koech y col., 1990). Como describieron Pedretti y col. (2006) en gatos FIV⁺, se ha observado en el presente estudio una remisión de los signos clínicos a lo largo del tratamiento (V1, V2 o V3) tanto en gatos FeLV⁺ como FIV⁺ (Figura 4.3.1.). Esta mejoría inespecífica y general coincide con lo observado por otros investigadores en estudios con Virbagen Omega® (rFeIFN- ω) (De Mari y col., 2004; Doménech y col., 2011; Hennet y col., 2011; Lutz y col., 2009; Gil y col., 2013 y 2014).

Ningún gato FeLV⁺ o FIV⁺ sin signos clínicos en la V0 los desarrolló durante y tras el tratamiento, lo que también ha sido descrito al aplicar Virbagen Omega® (rFeIFN- ω) (Doménech y col., 2011; Gil y col., 2014).

Aunque no se puede asegurar, debido a que no se cuenta con un grupo control de gatos no tratados, los resultados parecen indicar que el Roferon® no sólo es útil en los gatos que presentan signos clínicos, sino que también podría ser valioso evitando o retrasando que los gatos infectados, aparentemente sanos, empeoren su situación y manifiesten signos clínicos como consecuencia de una progresión de la infección retroviral. Todos estos datos parecen indicar que el tratamiento con Roferon® es capaz de mejorar la situación clínica de gatos infectados por FeLV o FIV de forma comparable al tratamiento con Virbagen Omega®.

Por último es importante señalar que en ambas infecciones: a) no siempre se produjo una remisión completa de los signos clínicos, b) hubo casos en los que la P.C. se mantuvo o aumentó durante y tras el tratamiento y, c) algunos (tres) gatos murieron. Estas tres observaciones negativas, junto con el aumento de la P.C. en la V3 de los gatos FIV⁺, lleva a plantearse si el tiempo que se administró el tratamiento fue suficiente, y si es necesario que el ciclo de tratamiento de Roferon® sea más largo o se repita para favorecer la remisión completa de los signos clínicos y evitar el “efecto rebote” o reaparición de los mismos.

En resumen, los signos clínicos más prevalentes se redujeron gradualmente tras la administración de Roferon®. Además, en ningún caso los gatos sin signos clínicos en la V0 los desarrollaron durante el estudio. Aunque en algunos casos se ha observado una remisión completa de los signos clínicos, algunos gatos no tienen una recuperación clínica total o no superan la infección y mueren a pesar del tratamiento.

5.3.2. Seguimiento de la analítica sanguínea de la población incluida en el ensayo con Roferon®

5.3.2.1. Hemograma

El estudio de la evolución del hemograma en ambas retrovirosis es muy relevante, ya que no sólo es uno de los valores más importantes a tener en cuenta para evaluar el estado del gato enfermo, sino que además se ha utilizado como un factor predictivo de la evolución de la infección en los gatos FeLV⁺ (De Mari y col., 2004).

Tras la administración del Roferon® se observó una reducción en el porcentaje de alteración, y un aumento del valor medio global de los parámetros y del hemograma analizados en ambas retrovirosis (Figura 4.3.2. y Tabla 4.3.9.). Esto parece indicar que el Roferon® favorece la recuperación de la serie roja en los gatos FeLV⁺ y FIV⁺, un resultado similar al descrito por otros autores con rHuIFN- α (2a) (Pedretti y col., 2006) y con rFeIFN- ω (De Mari y col., 2004; Doménech y col., 2011). No sólo se registró un aumento del valor medio global sino que también aumentó el valor medio de los gatos que lo presentaban alterado en cada una de las visitas. Este resultado parece indicar que, aunque el Roferon® no pueda resolver totalmente las alteraciones del hemograma, sí puede mejorarlas con respecto a su situación inicial, y por tanto, favorecer la recuperación del gato.

Los resultados de otros autores han discrepado con los obtenidos en el presente trabajo, ya que no describieron una evolución positiva del hemograma con la administración del rHuIFN- α (2a) (Kociba y col., 1995; Kölbl y col., 2000; McCaw y col., 2001) o rFeIFN- ω (Gil y col., 2013 y 2014). Hay que tener en cuenta que en el estudio realizado por Kociba y col. (1995) se trataron gatos a los que se les había inoculado un aislado de FeLV que provocaba aplasia eritroide. Los ensayos que se realizan con aislados hipervirulentos y por vías diferentes a la natural no siempre provocan una respuesta similar a la infección natural (Doménech y col., 2006), y por tanto los malos resultados obtenidos con el Roferon® en este caso no tendrían que ser necesariamente extrapolables a una situación de infección natural. Por otro lado, la discrepancia de resultados entre este estudio y el de Kociba y col. (1995) podría ser debida a cierta limitación del Roferon®, que sólo sería capaz de dar lugar a una respuesta positiva en los gatos con anemia leve o moderada.

Se ha descrito en la discusión sobre situación inicial de la población en la V0 (apartado 5.2.3.1.) que, en los gatos FeLV⁺ la anemia parecía estar relacionada con el debilitamiento crónico y las infecciones secundarias

que se producen en los gatos infectados por este virus, aunque no se puede descartar el efecto supresor del virus en la médula ósea. Sin embargo, en los gatos FIV⁺ se relacionaría con la replicación de FIV en las células mononucleares que conduce a inmunosupresión y cambios en el sistema hematopoyético, aunque también podría originarse o agravarse por la cronicidad de la infección o las infecciones secundarias concomitantes. Por lo tanto, el interferón podría actuar a dos niveles para solventar o disminuir los procesos anémicos que se producen en los gatos FeLV⁺ y FIV⁺: a) podría disminuir la replicación de FeLV en los precursores hematopoyéticos y en las células del estroma, favoreciendo directamente la recuperación de los valores normales del hemograma, y b) podría presentar un efecto inmunomodulador, reduciendo el grado de inmunosupresión característico de estas infecciones retrovíricas, evitando o reduciendo la aparición de infecciones secundarias, las cuales provocan o agravan los procesos anémicos en los gatos FeLV⁺ y FIV⁺.

Durante la V3 se observó una respuesta y evolución con respecto a V0 diferente entre los gatos FeLV⁺ y FIV⁺ tratados con Roferon® en lo referente a la evolución del hemograma. En los gatos FeLV⁺ se observó durante la V3 la aparición del “efecto rebote”, caracterizado por: a) un aumento del porcentaje de gatos con los parámetros del hemograma analizados alterados entre la V2 (0%) y la V3 (50,0%) (Figura 4.3.2.) y, b) una disminución del valor medio de los tres parámetros del hemograma estudiados entre la V2 y la V3 (Tabla 4.3.9.). En los gatos FIV⁺ mejoraron los parámetros hematológicos, lo que se reflejó en una disminución del porcentaje de gatos FIV⁺ con los parámetros del hemograma alterado y un aumento del valor medio de los parámetros del hemograma entre la V2 y la V3 (Tabla 4.3.9.). Sin embargo, en varios gatos FeLV⁺ y FIV⁺ se desarrollaron o se mantuvieron alteraciones en la serie roja en alguna de las visitas realizadas. Como ocurría con la situación clínica, los resultados negativos registrados en los gatos FeLV⁺ y FIV⁺ llevan a plantearse si es necesario ampliar o repetir el ciclo de tratamiento, de modo que se obtenga una respuesta al Roferon® de la serie roja más intensa y duradera.

En resumen, la administración de Roferon® mejora los procesos anémicos que se originan durante las infecciones por FeLV y FIV, al menos en los cuadros leves o moderados. Este interferón podría actuar directamente, impidiendo que FeLV infecte a los precursores medulares de los eritrocitos, o indirectamente, mejorando la inmunidad y reduciendo las infecciones secundarias que provocan los cuadros anémicos en los gatos FeLV⁺ y FIV⁺ (efecto inmunomodulador).

5.3.2.2. Formula leucocitaria

El estudio de un immunoestimulante, como es el Roferon®, requiere el seguimiento de la evolución de la fórmula leucocitaria. La evolución y el seguimiento se han centrado tan sólo en las poblaciones neutrofílicas y linfocíticas, así como en el número total de leucocitos, debido a que éstas fueron las dos únicas poblaciones celulares alteradas de forma significativa en la V0 (apartado 4.2.3.2.).

En los gatos FeLV⁺ y FIV⁺ tratados con Roferon® disminuyó el porcentaje de gatos con leucopenia, neutropenia y linfopenia con respecto a V0 en las visitas V1 y V2 (Tabla 4.3.12.). El aumento de ambas poblaciones leucocitarias (neutrófilos y linfocitos) en los gatos con citopenias parecen mostrar que el Roferon® estimula la serie blanca de los gatos infectados por FeLV o FIV, favoreciendo que se recuperaran de los procesos de inmunodepresión y de la leucopenia, linfopenia y neutropenia inducidas por estos retrovirus. La acción del interferón podría ser doble: a) afectaría al ciclo de replicación del virus y por tanto se reduciría la infección de nuevas células, y b) estimularía la proliferación de los linfocitos. Esto podría ser uno de los motivos por lo que la situación clínica mejoraba durante el estudio, ya que el incremento de estas poblaciones celulares mejoraría la respuesta inmunitaria a nivel celular y humoral. Hasta el momento, en la bibliografía consultada no se han descrito reducciones en la presencia o en el grado de las leucopenias en otros estudios con gatos FeLV⁺ o FIV⁺ tratados con IFN- α , pero sin embargo, coincide con lo observado en otros estudios con rFeIFN- ω (Doménech y col., 2011; Gil y col., 2014).

En ambas retrovirosis se desarrollaron en algunos gatos procesos con recuentos de células blancas por encima de lo normal. En los gatos FeLV⁺ se observó un aumento del porcentaje de gatos con neutrofilia en la

V1 con respecto a la V0 (de ningún caso en la V0 a un 43,5% en la V1; Tabla 4.3.12.). En los gatos FIV⁺ fue la población linfocitaria la que se incrementó: el porcentaje de linfocitosis aumentó desde el 3,2% en la V0 hasta el 27,3% en la V2 (Tabla 4.3.12.). Por tanto, el IFN podría, no solo incrementar las células blancas en animales deficientes, sino también en aquellos en los que los valores son normales. Esta estimulación de la respuesta inmune explicaría la reducción de los signos clínicos y la reducción de la antigenemia (p24) y actividad RT de la V1 con respecto a la V0 (Figuras 4.3.8. y 4.3.9.)

Durante la V3, en los gatos FeLV⁺ se produjo un aumento de animales con procesos leucopénicos (del 9,5% en la V2 al 25,0% en la V3; Tabla 4.3.12.), debido fundamentalmente al aumento del porcentaje de linfopenia (del 4,8% en la V2 al 25,0% en la V3; Tabla 4.3.12.). Por otro lado, en los FIV⁺ se produjo un proceso similar aunque de menor importancia. Sin embargo, en este caso el aumento de la leucopenia (del 4,5% en la V2 al 8,3% en la V3; Tabla 4.3.12.) se debió a un aumento del porcentaje de neutropenias en la V3 (del 4,5% en la V2 al 21,7% en la V3; Tabla 4.3.12.). Esta evolución negativa parece mostrar que el Roferon®, al menos en relación con estos parámetros, ha dejado de tener el efecto deseado y de nuevo los valores vuelven a alterarse, posiblemente debido al avance de la infección. Este empeoramiento tras finalizar la administración del Roferon® también fue descrito por Pedretti y col., (2006), quienes también observaron una disminución de los recuentos de leucocitos tras finalizar la administración del tratamiento.

En los gatos FeLV⁺ el aumento de la linfopenia en la V3 se acompañó de un incremento de los gatos con neutrofilia (Tabla 4.3.12.). En este caso, este efecto podría deberse a la estimulación de la respuesta inmunitaria innata por la posible aparición de infecciones secundarias, aunque no estuvieron acompañadas de signos clínicos asociados, o por una nueva replicación del virus.

Por último, es importante señalar que en los frotis sanguíneos no se observaron alteraciones indicativas de procesos neoplásicos, por lo que los aumentos de poblaciones de la fórmula leucocitaria podrían deberse a procesos de etiología infecciosa. Esta teoría, se ve reforzada por el hecho de que el 47,1% de los gatos FeLV⁺ y el 50,0% de los gatos FIV⁺ con neutrofilia presentaron signos clínicos que podrían estar provocados por otro agente infeccioso o que podrían facilitar su entrada y posterior replicación.

En resumen, durante el tratamiento con Roferon® aumentaron transitoriamente los recuentos de neutrófilos y linfocitos en los gatos FeLV⁺ y FIV⁺, de modo que los porcentajes de gatos con leucopenia, neutropenia y linfopenia se redujeron, aumentando el porcentaje de gatos FeLV⁺ con neutrofilia y de gatos FIV⁺ con linfocitosis. El aumento de estas poblaciones, no relacionado con procesos neoplásicos, facilitaría una mayor respuesta del sistema inmunitario frente al virus y los agentes infecciosos concomitantes, reduciendo así la patogenia y el avance de la infección, mejorando el estado clínico. Sin embargo, como ocurre con otros parámetros, la eficacia del Roferon® disminuyó posteriormente, observándose durante la V3 porcentajes de leucopenia y linfopenia en los gatos FeLV⁺ y de neutropenia en los FIV⁺ similares a las previas al tratamiento.

5.3.2.3. Perfil bioquímico

El seguimiento de los parámetros de la bioquímica clínica que se estudiaron permite valorar si el Roferon® reduce las alteraciones observadas en la bioquímica clínica en el día cero, o si su administración tiene efectos adversos sobre la funcionalidad renal y/o hepática.

En primer lugar, la proporción de gatos FeLV⁺ y FIV⁺ con alteración en los niveles de ALT permaneció estable y en niveles bajos (0-8,3%) durante todo el estudio (Figura 4.3.4.), lo que parece indicar que el Roferon® no presenta hepatotoxicidad en el tiempo, concentración y vía de administración utilizadas. En otros estudios realizados con rHuIFN- α en gatos no se observó alteración en este parámetro (Kociba y col., 1995; Weiss y col., 1991; Kölbl y col., 2000). Sin embargo, en el estudio de Gil y col. (2014) con rFeIFN- ω en gatos FIV⁺ detectaron elevaciones transitorias de ALT, aunque no se acompañaron de otras alteraciones bioquímicas o clínicas.

La lipidosi hepática es la alteración que aparece con más frecuencia en los gatos FeLV⁺ y FIV⁺, como consecuencia de estados de decaimiento y anorexia prolongados (Reinacher y col., 1995; Hofmann-Lehmann y col., 1997). Como se resaltó en el apartado 5.2.3.3., el escaso porcentaje de gatos con alteraciones hepáticas en el estudio podría ser debido al tipo de selección realizada, ya que los gatos con peor pronóstico fueron excluidos del estudio, y son precisamente aquéllos que tienen más probabilidad de desarrollar lipidosi hepática. Si se hubiera realizado el estudio con gatos con alteraciones hepáticas, quizás se hubiera observado una recuperación de dicha alteraciones con el tratamiento, debido a la reducción de los procesos de anorexia y disorexia que se producen con la administración de Roferon® (apartado 5.3.1.).

Los valores de urea estuvieron alterados en el 12,5% de los gatos FeLV⁺ y en el 23,5% de los FIV⁺, manteniéndose estos porcentajes estables a lo largo del estudio (Figura 4.3.4.). Sin embargo, sí se observó que durante la V2 en los gatos FeLV⁺ y FIV⁺ se produjo un incremento del porcentaje de gatos con alteración en los niveles de creatinina, hasta alcanzar el 23,5% en los FeLV⁺ y el 13,0% en los FIV⁺ (Figura 4.3.4.). Entre la V2 y la V3 se redujo el porcentaje de gatos FeLV⁺ con los niveles de urea alterados (Figura 4.3.4.). El aumento del porcentaje de gatos con los niveles de urea alterados en el momento de finalizar la administración de Roferon®, y su disminución posterior, podría indicar que el Roferon® en los gatos FeLV⁺ y FIV⁺ afectaría directa o indirectamente la funcionalidad renal.

Todos los gatos en los que se produjo un aumento de los niveles altos de urea y/o creatinina presentaban hipergammaglobulinemia. Cómo se desarrollará más adelante (apartado 5.3.2.4.), el Roferon® podría estimular la respuesta inmunitaria humoral, aumentando la producción de anticuerpos circulantes. Esto podría haber dado lugar al depósito de inmunocomplejos en el glomérulo ocasionando una disminución de la tasa de filtración, y por tanto un aumento de la urea y creatinina plasmática, desarrollándose un efecto secundario no deseable a nivel renal.

Se considera que la alteración de la función renal es un elemento de mal pronóstico en los gatos FeLV⁺ y FIV⁺ (Poli y col., 1995b). Para evaluar el grado de enfermedad renal sería necesario realizar más pruebas, además de la determinación de la concentración de urea y creatinina plasmática, como son: la presencia de proteínas en orina, la concentración de fósforo plasmático, la determinación de la presión arterial, o la presencia de depósitos amiloides en el glomérulo, característicos de las lesiones renales en estas infecciones retrovirales (Poli y col., 1995b). Como no se realizaron estas pruebas no se pudo determinar si existía en la V0 enfermedad renal.

Como se ha mencionado anteriormente, las alteraciones renales llevan asociadas en muchos casos proteinuria. Entre las proteínas eliminadas en la orina se encuentra la albúmina, cuya concentración plasmática podría disminuir por este motivo (hipoalbuminemia). Dos gatos, uno FeLV⁺ y otro FIV⁺, tratados con Roferon® presentaron hipoalbuminemia y elevados valores de urea. El gato FeLV⁺ falleció entre V2 y V3, mientras que el FIV⁺ no presentó signos clínicos asociados a alteraciones renales. Aunque, no se pudo comprobar la alteración renal, existe la posibilidad que el gato FeLV⁺ presentara una enfermedad renal, de modo que se confirmaría que esta lesión es un signo de mal pronóstico en las retrovirosis. Por otro lado, la ausencia de signos clínicos en el gato FIV⁺ no descarta la presencia de alteración renal, ya que este gato podría encontrarse en una fase inicial de enfermedad renal y los signos clínicos asociados aparecieran posteriormente.

En resumen, el tratamiento con Roferon® no parece producir hepatotoxicidad puesto que los parámetros hepáticos (ALT) no se alteraron con su administración. En cambio, se podría pensar que sí produce cierta alteración de la funcionalidad renal. No obstante, no se puede descartar el efecto directo del virus.

5.3.2.4. Análisis y electroforesis de las proteínas plasmáticas (proteinograma)

El proteinograma ha sido utilizado por los veterinarios clínicos como una herramienta importante en la evaluación y el seguimiento de enfermedades infecciosas y parasitarias en pequeños animales. Por ejemplo, en PIF (Peritonitis Infecciosa Felina) la evidenciación de seroconversión permite orientar el diagnóstico

definitivo de la enfermedad (Hartmann, 2005); por otro lado, en la leishmaniosis el uso del proteinograma es útil para evaluar si el parásito se encuentra en una fase replicativa o latente, de modo que su valoración permite establecer un protocolo terapéutico adecuado (Miro y col., 2007). Además, puede ser útil como examen complementario para valorar el sistema inmunitario en los animales tras un tratamiento con antivirales o con inmunomoduladores como el interferón.

En relación con las alfa globulinas y la albúmina, el porcentaje de alteración de las mismas fue muy bajo durante todo el estudio (Tabla 4.3.18.), no observándose diferencias significativas en su evolución con la administración del tratamiento de Roferon®.

Durante el estudio incrementó en la V1 el porcentaje de gatos FeLV⁺ con hiperproteinemia (del 29,6% en la V0 al 56,0% en la V1), hipergammaglobulinemia (del 40,7% en la V0 al 83,3% en la V1) y disproteinemia (del 25,9% en la V0 al 70,8% en la V1) (Tabla 4.3.18.). El porcentaje de gatos FeLV⁺ que presentaron hipergammaglobulinemia se mantuvo alrededor del 80,0% durante todo el estudio, el doble que el que se observó en la V0. Se podría relacionar el incremento de la gammaglobulinemia con la administración del Roferon®, aunque no se puede descartar el efecto directo del virus ya que no se realizaron biopsias renales. Los resultados también muestran como la estimulación de gammaglobulinas se produjo muy rápidamente, puesto que ya en la V1 un 76,9% de los gatos FeLV⁺ con las gammaglobulinas normales en la V0 desarrollaron hipergammaglobulinemia en la V1 (Tabla 4.3.19.).

Por otro lado, en los gatos FeLV⁺ se observó que el porcentaje de gatos con disproteinemia no fue paralelo al de hipergammaglobulinemia; el porcentaje de gatos con disproteinemia se redujo secuencialmente del 70,8% en la V1 al 36,4% en la V3 (Tabla 4.3.18.), mientras que el porcentaje de gatos con hipergammaglobulinemia se mantuvo estable 83,3% y 81,1% en V1 y V3 respectivamente. Esto se debería a un descenso moderado de la concentración de gammaglobulinas entre V2 y V3 (Tabla 4.3.20.), de modo que aunque la concentración se mantuvo por encima del rango de la normalidad no fue lo suficientemente importante como para que el cociente A/G presentara valores considerados anormales.

En los gatos FeLV⁺ se ha descrito que la evolución de la patogenia depende principalmente de la respuesta inmunitaria, ya que una respuesta humoral y celular fuerte y temprana permite que el gato supere la enfermedad o la mantenga controlada. En el presente estudio, el aumento de gatos con hipergammaglobulinemia ha coincidido temporalmente con la disminución de la concentración de proteína p27, de la actividad RT y de la carga vírica plasmática. Sin embargo, estadísticamente no se ha observado una correlación significativa entre las gammaglobulinas y los parámetros virológicos analizados (apartado 4.3.2.4.). La disminución de la concentración de p27 podría favorecer el desarrollo de la respuesta inmunitaria humoral efectiva, ya que en los gatos FeLV⁺ se ha descrito un proceso conocido como “anergia inmunológica”, en el que la respuesta humoral no se desarrolla correctamente debido a un exceso de proteína p27 (Jarret, 1999).

Durante el estudio incrementó el porcentaje de gatos FIV⁺ con hiperproteinemia (del 51,6% en la V0 al 70,8% en la V2), hipergammaglobulinemia (del 80,6% en la V0 al 100% en la V2) y disproteinemia (del 38,7% en la V0 al 77,3% en la V2) (Tabla 4.3.18.). En la V2 fue cuando los porcentajes de alteración del proteinograma fueron máximos, así como el valor medio de la concentración de gammaglobulinas (Tablas 4.3.18 y 4.3.20.), lo que parece indicar que en el caso de la infección por FIV es necesario un mayor tiempo de tratamiento para que se produzca un incremento de las gammaglobulinas en sangre en comparación con los gatos FeLV⁺. En los gatos FIV⁺, la concentración de gammaglobulinas y el porcentaje de gatos con gammaglobulinas, proteínas totales y cociente A/G alterado disminuyeron entre la V2 y la V3, alcanzando valores similares o inferiores a los obtenidos en la V0 (Tablas 4.3.18 y 4.3.20.). Este resultado mostraría, una vez más, que la respuesta al Roferon® es limitada en el tiempo.

En las infecciones por FIV los niveles de gammaglobulinas se mantienen elevados y constantes durante largos periodos de tiempo, observándose un descenso de los mismos en las etapas finales de la infección, cuando se produce una disminución marcada del cociente CD4⁺/CD8⁺ (Pedersen y col., 1987). Por lo tanto, no

se podría relacionar la aparición de anticuerpos con una curación de la infección. La hipergammaglobulinemia se ha asociado en la infección por FIV con la concurrencia de infecciones oportunistas y una activación policlonal linfocitaria (Gleich y Hartmann, 2009; Hartmann, 2011). De igual forma, en la infección por HIV se ha descrito que la hipergammaglobulinemia se produce por la activación policlonal aberrante de linfocitos B vírgenes, a la vez que el número de linfocitos B de memoria disminuye favoreciendo con ello el desarrollo de infecciones concomitantes (De Milito y col., 2004). En el presente estudio, una proporción de las inmunoglobulinas formadas por la estimulación del Roferon® podrían dirigirse frente a los antígenos de las infecciones concomitantes, de modo que su desarrollo podría contribuir a la recuperación de dichas infecciones y mejorar el estado clínico. Para comprobar si los anticuerpos que se están formando son frente al retrovirus o frente a otros agentes hubiera sido necesario realizar un estudio de las gammaglobulinas formadas, separando los anticuerpos anti-proteínas víricas de los formados frente a los epítomos de los otros agentes infecciosos. Esta práctica sería imposible, ya que habría que realizarla frente a todos los posibles agentes infecciosos implicados.

En general, se puede considerar que muchas de estas alteraciones son consecuencia directa o indirecta del tratamiento con interferón, ya que estas moléculas aumentan la producción de anticuerpos, además de otros efectos sobre el sistema inmunitario, como son la inducción de la maduración y activación de células dendríticas, el incremento en las mismas de la expresión de moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad de clases I y II, citoquinas y receptores de citoquinas, y moléculas coestimuladoras. Estas moléculas facilitan la presentación de antígenos, la activación y la diferenciación de las células inmunitarias (Rönblom y col., 2006), lo que podría estar relacionado con lo observado en el presente estudio.

En resumen, el tratamiento con Roferon® estimula la formación de gammaglobulinas, aumentando de este modo su concentración en el plasma y provocando un aumento de la hiperproteinemia y disproteinemia en los gatos FeLV⁺ y FIV⁺ tratados. En el caso de FeLV⁺ la respuesta al tratamiento es muy rápida, alcanzándose el máximo de respuesta en la V1, mientras en los gatos FIV⁺ el valor máximo de gammaglobulinas se alcanza en la V2. En todas las visitas, el valor medio de gammaglobulinas fue superior en los gatos FIV⁺ que en los gatos FeLV⁺. En ambas infecciones, se observa que el porcentaje de disproteinemia en la V3 se reduce a valores similares a antes de iniciar el tratamiento, como consecuencia de una reducción de la concentración de gammaglobulinas. Por tanto, el “efecto rebote” se refleja también en el proteinograma de los gatos FeLV⁺ y FIV⁺ tratados con Roferon®.

5.3.2.5. Cociente de poblaciones CD4⁺/CD8⁺

Se ha descrito que los gatos infectados por FeLV y/o FIV presentan disminuido el cociente CD4⁺/CD8⁺ (Hartmann, 2005; Dunham y Graham, 2008; Sellon y Hartmann, 2008). Nuestros resultados de V0 apoyan esta observación, relacionándola con la presencia de signos clínicos. Al igual que en la infección por HIV, el seguimiento del cociente puede aportar información útil para conocer el estado de la infección (Uppal y col., 2003; Ray y col., 2006; Janossy y Shapiro, 2008). De modo que la variación del cociente CD4⁺/CD8⁺ será importante en la valoración de la eficacia del Roferon®.

En ambas infecciones se produjo un aumento de la media del cociente CD4⁺/CD8⁺ tras la administración del Roferon®, así como una disminución del porcentaje de gatos con el cociente CD4⁺/CD8⁺ alterado (Tablas 4.3.23. y 4.3.24.). Este resultado discrepa con el observado en otros estudios en los que no se describieron diferencias significativas en la evolución del cociente CD4⁺/CD8⁺ en gatos FeLV⁺ y FIV⁺ tras la administración del rHuIFN-α; incluso en los gatos FeLV⁺ se ha descrito un descenso de dicho cociente ocho meses después del tratamiento (Riondato y col., 2003; Pedretti y col., 2006). Sin embargo, otros autores han defendido que el rHuIFN-α podría regular el efecto inmunomodulador de los linfocitos T CD4⁺ y la activación de los linfocitos CD8⁺, favoreciendo el desarrollo la respuesta inmunitaria protectora (Tompkins, 1999). Esta respuesta inmunomoduladora es importante ya que como se mencionó durante la evaluación de la situación inicial, los gatos presentaron un porcentaje de alteración del CD4⁺/CD8⁺ del 26,1% en los FeLV⁺ y del 69,2% en los FIV⁺ (Tabla 4.2.32.).

En los gatos FeLV⁺ se observó una evolución positiva del cociente CD4⁺/CD8⁺ durante las tres visitas. En la V3 el valor medio fue máximo (2,38; Tabla 4.3.23.) y ningún gato presentó el CD4⁺/CD8⁺ alterado (Tabla 4.3.24.). La mejoría del cociente entre la V2 y la V3 no parece coincidir con los resultados obtenidos en otros parámetros, como el hemograma, la concentración de proteína p27 y la actividad RT, ya que en ellos el momento de máxima mejoría se produjo durante la V2 y la eficacia del tratamiento disminuyó entre la V2 y la V3 (apartado 4.3.2.5.). Posiblemente, esta diferencia sea debida a que el cociente CD4⁺/CD8⁺ esté menos influenciado por la infección de FeLV que los otros parámetros, de modo que, la respuesta al Roferon® tarda más en aparecer pero su efecto tiene una mayor duración.

En los gatos FIV⁺ se observó una respuesta del cociente CD4⁺/CD8⁺ al tratamiento más rápida que en los gatos FeLV⁺. En el 93,8% de los gatos FIV⁺ aumentó el cociente entre la V0 y la V1 (Figura 4.3.7.) frente al 41,2% de los FeLV⁺ (Figura 4.3.6.). Por otro lado, en la V2, la media del cociente CD4⁺/CD8⁺ fue la máxima (1,40) y el porcentaje de gatos con CD4⁺/CD8⁺ alterado era el mínimo que se observó en todo el estudio (20,0%) (Tablas 4.3.23. y 4.3.24.). En la V3 se produjo de nuevo un empeoramiento de todos los parámetros analizados, aunque en la V3 el valor medio era mayor que en la V0 (0,8 en la V0 y 1,29 en la V3), el porcentaje de gatos con el cociente alterado era menor que el de la V0 (69,0% en la V0 y 35,0% en la V3) y un 50,0% de los gatos presentaban el cociente CD4⁺/CD8⁺ aumentado un 20,0% con respecto a V0, frente al 14,3% que lo presentaban disminuido (Figura 4.3.7.). Este resultado fue compatible con el publicado por Pedretti y col., (2006), quienes describieron una leve mejoría temporal del cociente CD4⁺/CD8⁺ de los gatos FIV⁺ tratados con rHuIFN-α(2a), pero posteriormente en su estudio también se produjo un empeoramiento ocho meses después de finalizar el tratamiento.

Los resultados con rHuIFN-α sobre el cociente CD4⁺/CD8⁺ contrastan con la ausencia de efecto claro en gatos FeLV⁺ y FIV⁺ tratados con rFeIFN-ω (Doménech y col., 2011). Esto parece sugerir que el Roferon® tendría un efecto más positivo en la recuperación del cociente CD4⁺/CD8⁺ que el Virbagen Omega®, lo que sería beneficioso para la evolución de la infección.

Previamente se ha descrito que no existía correlación entre los signos clínicos y la variación del cociente CD4⁺/CD8⁺ durante el tratamiento con rHuIFN-α (Riondato y col., 2003) y con rFeIFN-ω (Doménech y col., 2011). Sin embargo, en el presente estudio la mayoría de los gatos tratados con Roferon® mejoraron el cociente CD4⁺/CD8⁺ (Tablas 4.3.21. y 4.3.22.), a la vez que también lo hacía su estado clínico (Tablas 4.3.1. y 4.3.2.).

En resumen, estos resultados parecen indicar que en los gatos FIV⁺ y FeLV⁺ el Roferon® mejora el cociente CD4⁺/CD8⁺. En el caso de FIV⁺ la respuesta es más rápida pero menos duradera que en el caso de FeLV⁺; esta diferencia podría estar debida a que el cociente CD4⁺/CD8⁺ está más afectado por la infección de FIV que de FeLV, y los efectos positivos desaparecen antes al no administrar el Roferon®.

5.3.2.6. Detección de anticuerpos anti-Interferón

Las dosis de Roferon® administradas inicialmente en el tratamiento de las retrovirosis felinas fueron de 10⁵-10⁶ UI/kg, vía subcutánea (Zeidner y col., 1990). La administración de estas dosis altas por esta vía inducía la formación de anticuerpos anti-interferón en los gatos tratados.

Los resultados del presente estudio con bajas dosis de IFN administradas oralmente (60 UI/gato/día) confirma los resultados descritos anteriormente por Weiss y col. (1991), en el sentido de que bajas concentraciones de Roferon® administradas oralmente no inducen la formación de anticuerpos frente al interferón administrado. De este modo se evitan los posibles efectos negativos que pudieran ejercer estos anticuerpos, como sería la inmunidad cruzada con el interferón felino natural. Además, el resultado negativo de esta prueba descarta que el aumento de gammaglobulinas se produjera como consecuencia de la respuesta del sistema inmunitario del gato frente al Roferon®.

5.3.3. Resultados y seguimiento de la infección vírica de la población incluida en el ensayo con Roferon®

5.3.3.1. Proteínas víricas p27 y Actividad retrotranscriptasa (RT) de FeLV

Como se mencionó anteriormente, la proteína p27 es un marcador de antígeno circulante de FeLV en sangre (Hartmann, 2008; Willet y Hosie, 2013), y la actividad RT es proporcional al número de partículas víricas infectivas circulantes (Tejerizo y col., 2005). Por tanto el seguimiento de ambas proteínas proporciona información sobre la evolución del virus tras la administración del tratamiento con Roferon®.

En la V1 y V2 se registró una reducción de la concentración de proteína p27 y de la actividad RT de los gatos FeLV⁺ tratados con Roferon®. En la V2, el valor medio de la concentración de p27 se redujo con respecto a la V0 un 23,6% y la actividad RT un 96,15% (Tablas 4.3.26. y 4.3.30.). Además, aproximadamente en un 60% de los gatos FeLV⁺ se redujo la concentración de p27 en la V1 y la V2 con respecto a la V0, y en un 75% la actividad RT (Figuras 4.3.8. y 4.3.9.). Estos resultados parecen indicar que el Roferon® disminuye en los gatos FeLV⁺ la antigenemia y el número de partículas víricas infectivas. Al igual que en el presente estudio, la disminución de la concentración de p27 en sangre con el tratamiento con rHuIFN- α ha sido descrita en otro estudio (Zeidner y col., 1990).

La actividad RT tuvo una respuesta más positiva que la concentración de p27 al tratamiento con Roferon®, ya que: a) el valor medio de actividad RT se redujo en mayor proporción que el de la concentración de p27, y b) el porcentaje de gatos en los que se redujo la actividad RT fue mayor que en los que se redujo la concentración de p27. Esto podría deberse a que el interferón actúa sobre el ensamblaje y formación de las partículas víricas (Feng y col., 2003). Al afectar a este punto y no a la síntesis proteica, se puede producir la liberación de partículas incompletas no infectivas, con proteína p27 pero sin actividad RT, que manera que la concentración plasmática de p27 se reduce menos que la actividad RT. Esto coincide con los resultados de nuestro estudio *in vitro* (apartado 4.1) en el que se observó que el IFN no afectaba a la síntesis proteica pero sí a la actividad RT (Collado y col., 2007).

En los gatos FeLV⁺ altos niveles de estas proteínas víricas están relacionados con fases finales y progresivas de la infección y con un descenso en la formación de anticuerpos neutralizantes debidos a la inmunodeficiencia (Zeidner y col., 1990). En los enfermos por HIV se ha observado que la reducción de los niveles de p24 circulante inducidos por IFN- α se correlacionan con un aumento de linfocitos T CD4⁺ y una respuesta antitumoral frente al sarcoma de Kaposi (Spano y col., 2000). Por estos motivos se consideraría la disminución de la antigenemia tras el tratamiento con Roferon® como un resultado positivo del tratamiento.

Al igual que ocurría con otros parámetros clínicos, como el hemograma, se observó un empeoramiento de los valores p27 y actividad RT durante la V3. En esta visita se incrementó la concentración de p27 en el 66,7% de los gatos y aumentó la concentración media de p27 un 31,5% con respecto a V0; se incrementó la actividad RT en el 20,0% de los gatos positivos a RT en V0 y en el 42,9% negativos a RT en V0. De igual forma, el porcentaje de reducción de actividad RT con respecto a V0 disminuyó del 96,15% en la V2 al 60,50% en la V3 (Tabla 4.3.30). Todos estos resultados parecen indicar que el efecto del Roferon® sobre estos parámetros se redujo al dejar de administrar el tratamiento, produciéndose también un “efecto rebote”. Zeidner y col. (1990) describieron una disminución de la concentración de p27 al iniciar el tratamiento con rHuIFN- α , seguido de un incremento de la misma al finalizarlo, de forma similar a lo observado en el presente estudio.

En resumen, en los gatos FeLV⁺ tratados con Roferon® se produjo una disminución de la actividad RT y de la concentración de p27 en el plasma. El efecto sobre la actividad RT es más marcado que sobre la antigenemia (concentración de p27), lo que podría deberse a que el interferón parece bloquear la maduración y liberación de las partículas víricas infectivas, cuantificadas mediante la actividad RT, sin interferir en la síntesis de proteínas víricas, estudiada a través de los valores de antigenemia.

5.3.3.2. Carga provírica de FeLV y FIV

El estudio de la carga provírica en las infecciones retrovíricas es importante, ya que ofrece información del número de células infectadas y por tanto, del avance de la infección.

Entre el 70-83% de los gatos FIV⁺ tratados con Roferon® no variaron su carga provírica, y la mantuvieron en valores similares a los de la V0 (Figura 4.3.12.). Por tanto, los resultados parecen mostrar que en el caso de FIV⁺ el tratamiento con Roferon® no produce una mejoría sustancial en la carga provírica, aunque la ausencia de un grupo control impide saber si el tratamiento ha evitado que se produjera un incremento de la misma al avanzar la infección. Por otra parte y como se ha mencionado en otros apartados de esta Memoria, la cantidad de virus circulante y de células con provirus en el caso de los gatos FIV⁺ es escasa, por lo que el tratamiento con interferón podría no haber inducido un efecto observable sobre la misma. En el estudio realizado por Pedretti y col. (2006) se describió una reducción de la carga provírica en gatos FIV⁺, tanto del grupo control y como del grupo tratado con Roferon®, no hallándose diferencias significativas entre ambos grupos.

En el 59,1% de los gatos FeLV⁺ tratados con Roferon® disminuyó la carga provírica entre la V0 y la V2 (Figura 4.3.11.). Posteriormente, en la V3, el porcentaje de gatos en los que disminuyó la carga provírica descendió al 33,3% (Figura 4.3.11.). Este empeoramiento coincide con el descrito en este estudio para otros parámetros víricos y clínicos. Es importante señalar que, en todas las visitas, aproximadamente en el 15% de los gatos se produjo un aumento de la carga provírica y entre 30 y un 50% de los gatos FeLV⁺ la mantuvieron a niveles similares a los de la V0 (Figura 4.3.11.). En definitiva la respuesta al IFN- α respecto a la carga provírica no parece tan positiva como la alcanzada con la actividad RT o la proteína p27.

Los resultados con rHuIFN- α , aunque transitorios, contrastan con los previamente reportados con rFeIFN- ω , en los que no se han observado mejorías sustanciales en la carga provírica (Doménech y col., 2011). Incluso se ha descrito un incremento de la carga provírica en gatos FIV⁺ tras la administración de rFeIFN- ω por vía subcutánea que se ha asociado al aumento en el recuento de linfocitos detectados en algunos animales (Leal y col., 2015). Esto podría indicar que el Roferon® tendría un efecto más positivo en la recuperación de la carga proviral que el Virbagen Omega®, aunque serían necesarios más estudios para poder comprobarlo.

En resumen, en los gatos FIV⁺ no se han observado variaciones importantes de la carga provírica tras el tratamiento con Roferon®. En cambio, en los gatos FeLV⁺ se observó una mejoría transitoria en los niveles de provirus en sangre circulante, aunque no fueron tan significativos como los obtenidos con la p27 o la actividad RT.

5.3.4. Compilación de resultados y seguimiento de la población incluida en el ensayo con Roferon®

Tanto en los gatos FeLV⁺ como en los FIV⁺ se ha observado que el tratamiento con Roferon® podría contribuir a: 1. una mejora de los signos clínicos, 2. la elevación del número de eritrocitos, lo que reduciría y mejoraría los cuadros de anemia, 3. elevar los recuentos de neutrófilos y linfocitos, facilitando una mejor y mayor respuesta inmunitaria frente al virus y los agentes infecciosos concomitantes, y 4. una mejora del cociente CD4⁺/CD8⁺. Con la administración de Roferon® también se ha observado un incremento de las gammaglobulinas, que podría ser indicativa de una mejora de la respuesta inmune, aunque también podría relacionarse con una enfermedad renal..

En el caso de los parámetros virológicos, en el caso de FeLV se ha observado una mejora tanto de la antigenemia (p27), de la actividad RT y de la cantidad de provirus circulante. En el caso de FIV no se han observado variaciones de provirus circulante con la administración de Roferon®. Estos resultados se corroboran por los obtenidos en el estudio in vitro (apartado 3.1) que sugieren que el IFN-I afecta fundamentalmente a la actividad RT más que a la síntesis de proteínas víricas.

Con respecto a los signos clínicos y al cociente $CD4^+/CD8^+$ se ha observado una respuesta más rápida al tratamiento en los gatos FIV^+ que en los $FeLV^+$, aunque también esta situación se revirtió antes y la mayoría de los parámetros empeoraron antes en los gatos FIV^+ que en los $FeLV^+$. En cualquier caso, el empeoramiento de algunos de los parámetros medidos tras finalizar la administración del tratamiento, llevaría a plantearse si el tratamiento con Roferon® es lo suficientemente largo, o si es necesario repetirlo, para consolidar la mejoría en el tiempo.

CONCLUSIONES

1. Los interferones de tipo I (IFN- α , IFN- ω) empleados en los estudios *in vitro* no afectan la síntesis proteica viral en las células infectadas por los virus de la leucemia (FeLV) e inmunodeficiencia felina (FIV), pero sí reducen la formación de partículas infectivas libres, por lo que su efecto parece ser en las fases de maduración y ensamblaje de los virus. Esto puede estar relacionado con las alteraciones en la membrana celular ocasionadas por los procesos de apoptosis o de necrosis inducidos en las células infectadas por FeLV o por FIV, respectivamente.
2. La infección por FeLV tiene consecuencias más graves que la infección por FIV. Así, la leucemia felina afecta a gatos más jóvenes que desarrollan signos clínicos más graves y en menos tiempo, mientras que la inmunodeficiencia felina afecta a gatos de más edad que conviven con la infección durante mucho más tiempo, con cuadros clínicos en general más leves.
3. FeLV infecta fundamentalmente a precursores de la médula ósea, lo que se deduce de la disminución, de forma simultánea, de los recuentos de distintas poblaciones celulares, especialmente de neutrófilos y de linfocitos, a diferencia de lo observado en los gatos infectados por FIV, en los que disminuyen preferentemente los recuentos de una sola de estas poblaciones celulares. Además, ambos virus inducen anemia en la mayoría de los gatos estudiados.
4. El tratamiento con IFN- α recombinante humano en gatos infectados por FeLV o por FIV reduce la anemia y eleva los recuentos de neutrófilos, linfocitos, la concentración de gammaglobulinas, y el cociente CD4+/CD8+, facilitando una mejor y mayor respuesta inmunitaria frente al virus y a posibles agentes infecciosos concomitantes, y, por tanto, produciendo una evolución clínica favorable de los gatos tratados. Además, en los gatos infectados por el virus de la leucemia felina esta recuperación clínica puede asociarse a reducción de la antigenemia, de la actividad RT y de la carga proviral.
5. El tratamiento oral con IFN- α recombinante humano a la dosis terapéutica empleada de 60 UI/día en semanas alternas durante 120 días demuestra una buena tolerancia en los gatos infectados por los virus de la leucemia e inmunodeficiencia felinas, no induce la formación de anticuerpos anti-interferón, es fácil de administrar y su coste es asumible. Por todo ello, es una buena alternativa en el manejo clínico de estas dos enfermedades víricas.
6. El carácter transitorio de la mejoría clínica, biopatológica y virológica, no superior a los seis meses, hace necesario plantear nuevos protocolos de tratamiento, manteniendo las dosis empleadas pero prolongando los periodos de administración.

BIBLIOGRAFÍA

- Aboud, M., Moldovan-Levin, D., y Salzberg, S. (1981). Cytoplasmic viral DNA synthesis in exogenous infection of murine leukemia virus: effect of interferon and cycloheximide. *J. Virol.* 37, 836–839.
- Ackley, C.D., Yamamoto, J.K., Levy, N., Pedersen, N.C., y Cooper, M.D. (1990). Immunologic abnormalities in pathogen-free cats experimentally infected with feline immunodeficiency virus. *J. Virol.* 64, 5652–5655.
- Agy, M.B., Acker, R.L., Sherbert, C.H., Katze, M.G. (1995). Interferon treatment inhibits virus replication in HIV-1- and SIV-infected CD4+ T-cell lines by distinct mechanisms: evidence for decreased stability and aberrant processing of HIV-1 proteins. *Virology* 214, 379–386.
- Alsharifi, M., Müllbacher, A., Regner, M. (2008). Interferon type I responses in primary and secondary infections. *Immunol. Cell Biol.* 86, 239–245.
- Andersen, P.R., Tyrrell, P. (2004). Feline immunodeficiency virus diagnosis after vaccination. *Anim Health Res Rev* 5, 327–330.
- Anderson, M.M., Luring, A.S., Burns, C.C., Overbaugh, J. (2000). Identification of a cellular cofactor required for infection by feline leukemia virus. *Science* 287, 1828–1830.
- Anderson, M.M., Luring, A.S., Robertson, S., Dirks, C., Overbaugh, J. (2001). Feline Pit2 functions as a receptor for subgroup B feline leukemia viruses. *J. Virol.* 75, 10563–10572.
- Andrieu, M., Chassin, D., Desoutter, J.F., Bouchaert, I., Baillet, M., Hanau, D., Guillet, J.G., Hosmalin, A. (2001). Downregulation of major histocompatibility class I on human dendritic cells by HIV Nef impairs antigen presentation to HIV-specific CD8+ T lymphocytes. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 17, 1365–1370.
- Arai, M., Darman, J., Lewis, A., Yamamoto, J.K., Darnen, J. (2000). The use of human hematopoietic growth factors (rhGM-CSF and rhEPO) as a supportive therapy for FIV-infected cats. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 77, 71–92.
- Arjona, A., Escolar, E., Soto, I., Barquero, N., Martín, D., Gomez-Lucia, E. (2000). Seroepidemiological survey of infection by feline leukemia virus and immunodeficiency virus in Madrid and correlation with some clinical aspects. *J. Clin. Microbiol.* 38, 3448–3449.
- Arjona, A., Barquero, N., Doménech, A., Tejerizo, G., Collado, V.M., Toural, C., Martín, D., Gomez-Lucia, E. (2007). Evaluation of a novel nested PCR for the routine diagnosis of feline leukemia virus (FeLV) and feline immunodeficiency virus (FIV). *J. Feline Med. Surg.* 9, 14–22.
- Asefa, B., Klarmann, K.D., Copeland, N.G., Gilbert, D.J., Jenkins, N.A., Keller, J.R. (2004). The interferon-inducible p200 family of proteins: a perspective on their roles in cell cycle regulation and differentiation. *Blood Cells Mol. Dis.* 32, 155–167.
- Babé, L.M., Unal, A., y Craik, C.S. (1997). Obstruction of HIV-1 particle release by interferon-alpha occurs before viral protease processing and is independent of envelope glycoprotein. *J. Interferon Cytokine Res.* 17, 287–293.
- Baca-Regen, L., Heinzinger, N., Stevenson, M., Gendelman, H.E. (1994). Alpha interferon-induced antiretroviral activities: restriction of viral nucleic acid synthesis and progeny virion production in human immunodeficiency virus type 1-infected monocytes. *J. Virol.* 68, 7559–7565.
- Bach, E.A., Aguet, M., Schreiber, R.D. (1997). The IFN gamma receptor: a paradigm for cytokine receptor signaling. *Annu. Rev. Immunol.* 15, 563–591.
- Baldwin, S.L., Powell, T.D., Sellins, K.S., Radecki, S.V., Cohen, J.J., Milhausen, M.J. (2004). The biological effects of five feline IFN-alpha subtypes. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 99, 153–167.
- Bandyopadhyay, S.K., Leonard, G.T., Bandyopadhyay, T., Stark, G.R., Sen, G.C. (1995). Transcriptional induction by double-stranded RNA is mediated by interferon-stimulated response elements without activation of interferon-stimulated gene factor 3. *J. Biol. Chem.* 270, 19624–19629.
- Barber, G.N. (2000). The interferons and cell death: guardians of the cell or accomplices of apoptosis? *Semin. Cancer Biol.* 10, 103–111.
- Barber, G.N. (2011). Cytoplasmic DNA innate immune pathways. *Immunol. Rev.* 243, 99–108.
- Barr, M.C., Pough, M.B., Jacobson, R.H., Scott, F.W. (1991). Comparison and interpretation of diagnostic tests for feline immunodeficiency virus infection. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 199, 1377–1381.
- Barr, M.C. (1996). FIV, FeLV, FIPV: interpretation and misinterpretation of serological test results. *Semin. Vet. Med. Surg. Small Anim.* 11, 144–153.
- Basham, T.Y., Bourgeade, M.F., Creasey, A.A., Merigan, T.C. (1982). Interferon increases HLA synthesis in melanoma cells: interferon-resistant and -sensitive cell lines. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 79, 3265–3269.

- Beatty, J.A., Lawrence, C.E., Callanan, J.J., Grant, C.K., Gault, E.A., Neil, J.C., Jarrett, O. (1998). Feline immunodeficiency virus (FIV)-associated lymphoma: a potential role for immune dysfunction in tumorigenesis. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 65, 309–322.
- Beatty, J.A., Willett, B.J., Gault, E.A., Jarrett, O. (1996). A longitudinal study of feline immunodeficiency virus-specific cytotoxic T lymphocytes in experimentally infected cats, using antigen-specific induction. *J. Virol.* 70, 6199–6206.
- Beatty, J., Terry, A., MacDonald, J., Gault, E., Cevario, S., O'Brien, S.J., Cameron, E., Neil, J.C. (2002). Feline immunodeficiency virus integration in B-cell lymphoma identifies a candidate tumor suppressor gene on human chromosome 15q15. *Cancer Res.* 62, 7175–7180.
- Bekisz, J., Baron, S., Balinsky, C., Morrow, A., Zoon, K.C. (2010). Antiproliferative Properties of Type I and Type II Interferon. *Pharmaceuticals (Basel)* 3, 994–1015.
- Belardelli, F., Ferrantini, M., Proietti, E., Kirkwood, J.M. (2002). Interferon-alpha in tumor immunity and immunotherapy. *Cytokine Growth Factor Rev.* 13, 119–134.
- Bendinelli, M., Pistello, M., Lombardi, S., Poli, A., Garzelli, C., Matteucci, D., Ceccherini-Nelli, L., Malvaldi, G., Tozzini, F. (1995). Feline immunodeficiency virus: an interesting model for AIDS studies and an important cat pathogen. *Clin. Microbiol. Rev.* 8, 87–112.
- Benveniste, R.E., Sherr, C.J., Todaro, G.J. (1975). Evolution of type C viral genes: origin of feline leukemia virus. *Science* 190, 886–888.
- Bienzle, D., Reggeti, F., Wen, X., Little, S., Hobson, J., Kruth, S. (2004). The variability of serological and molecular diagnosis of feline immunodeficiency virus infection. *Can. Vet. J.* 45, 753–757.
- Billiau, A. (2006). Anti-inflammatory properties of Type I interferons. *Antiviral Res.* 71, 108–116.
- Biron, C.A. (2001). Interferons alpha and beta as immune regulators--a new look. *Immunity* 14, 661–664.
- Bisset, L.R., Lutz, H., Böni, J., Hofmann-Lehmann, R., Lüthy, R., Schüpbach, J. (2002). Combined effect of zidovudine (ZDV), lamivudine (3TC) and abacavir (ABC) antiretroviral therapy in suppressing *in vitro* FIV replication. *Antiviral Res.* 53, 35–45.
- Blanco, M. del M., y Orden, J.A. (2013). *Inmunología y enfermedades infecciosas del perro y el gato: manual gráfico* (Zaragoza: Servet).
- Bolen, C.R., Ding, S., Robek, M.D., Kleinstein, S.H. (2014). Dynamic expression profiling of type I and type III interferon-stimulated hepatocytes reveals a stable hierarchy of gene expression. *Hepatology* 59, 1262–1272.
- Brown, M.R., Rogers, K.S. (2001). Neutropenia in dogs and cats: a retrospective study of 261 cases. *J Am Anim Hosp Assoc* 37, 131–139.
- Bull, M.E., Kennedy-Stoskopf, S., Levine, J.F., Loomis, M., Gebhard, D.G., y Tompkins, W.A.F. (2003). Evaluation of T lymphocytes in captive african lions (*Panthera leo*) infected with feline immunodeficiency virus. *Am. J. Vet. Res.* 64, 1293–1300.
- Burkhard, M.J., Dean, G.A. (2003). Transmission and immunopathogenesis of FIV in cats as a model for HIV. *Curr. HIV Res.* 1, 15–29.
- Calandrella, M., Matteucci, D., Mazzetti, P., Poli, A. (2001). Densitometric analysis of Western blot assays for feline immunodeficiency virus antibodies. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 79, 261–271.
- Callanan, J.J., Thompson, H., Toth, S.R., O'Neil, B., Lawrence, C.E., Willett, B., Jarrett, O. (1992). Clinical and pathological findings in feline immunodeficiency virus experimental infection. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 35, 3–13.
- Caney, S. (2005). Antiviral therapy in cats: current rationale and recommendations. In *Prectice*, 27, 454-457
- Cantell, K., Pyhälä, L. (1973). Circulating interferon in rabbits after administration of human interferon by different routes. *J. Gen. Virol.* 20, 97–104.
- Carmichael, K.P., Bienzle, D., McDonnell, J.J. (2002). Feline leukemia virus-associated myelopathy in cats. *Vet. Pathol.* 39, 536–545.
- Carrasco, L. y Almendral del Río, J.M. (2006). *Virus patógenos* (Madrid: Editorial Hélice : Fundación BBVA).
- Chatterji, U., Grant, C.K., Elder, J.H. (2000). Feline immunodeficiency virus Vif localizes to the nucleus. *J. Virol.* 74, 2533–2540.
- Chatterji, U., de Parseval, A., Elder, J.H. (2002). Feline immunodeficiency virus OrfA is distinct from other lentivirus transactivators. *J. Virol.* 76, 9624–9634.
- Chaudhuri, A., Yang, B., Gendelman, H.E., Persidsky, Y., Kanmogne, G.D. (2008). STAT1 signaling modulates HIV-1-induced inflammatory responses and leukocyte transmigration across the blood-brain barrier. *Blood* 111, 2062–2072.

- Chawla-Sarkar, M., Lindner, D.J., Liu, Y.-F., Williams, B.R., Sen, G.C., Silverman, R.H., Borden, E.C. (2003). Apoptosis and interferons: role of interferon-stimulated genes as mediators of apoptosis. *Apoptosis* 8, 237–249.
- Chen, A.P., Essex, M.E. (1984). Infection with feline leukemia virus associated with induction of humoral response to a normal cell protein. *Cancer Invest.* 2, 81–90.
- Chen, H., Bechtel, M.K., Shi, Y., Phipps, A., Mathes, L.E., Hayes, K.A., and Roy-Burman, P. (1998). Pathogenicity induced by feline leukemia virus, Rickard strain, subgroup A plasmid DNA (pFRA). *J. Virol.* 72, 7048–7056.
- Coccia, E.M., Krust, B., Hovanessian, A.G. (1994). Specific inhibition of viral protein synthesis in HIV-infected cells in response to interferon treatment. *J. Biol. Chem.* 269, 23087–23094.
- Colonna, M., Krug, A., Cella, M. (2002). Interferon-producing cells: on the front line in immune responses against pathogens. *Curr. Opin. Immunol.* 14, 373–379.
- Copelan, E.A., Rinehart, J.J., Lewis, M., Mathes, L., Olsen, R., Sagone, A. (1983). The mechanism of retrovirus suppression of human T cell proliferation *in vitro*. *J. Immunol.* 131, 2017–2020.
- Correa, S.S., Mauldin, G.N., Mauldin, G.E., y Mooney, S.C. (2001). Serum alpha 1-acid glycoprotein concentration in cats with lymphoma. *J Am Anim Hosp Assoc* 37, 153–158.
- Cotter, S.M. (1979). Anemia associated with feline leukemia virus infection. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 175, 1191–1194.
- Cotter, S.M. (1992). Feline leukemia virus: pathophysiology, prevention, and treatment. *Cancer Invest.* 10, 173–181.
- Cotter, S.M. (1998). Feline viral neoplasia. In *Infectious Diseases of the Dog and Cat*, (Philadelphia, PA: WB Saunders), pp. 71–84.
- Court, E.A., Watson, A.D., Peaston, A.E. (1997). Retrospective study of 60 cases of feline lymphosarcoma. *Aust. Vet. J.* 75, 424–427.
- Cowgill, L. (1995). Cowgill LD. 1995. CVT update: use of recombinant human erythropoietin, pp 961-963. In Bonagura JD (ed): *Kirk's current veterinary therapy XII small animal practice*. WB Saunders, Philadelphia. In *Kirk's Current Veterinary Therapy XII Small Animal Practice*, (Saunders, Philadelphia.: Bonagura JD), pp. 961–963.
- Crawford, P.C., Papadi, G.P., Levy, J.K., Benson, N.A., Mergia, A., Johnson, C.M. (2001). Tissue dynamics of CD8 lymphocytes that suppress viral replication in cats infected neonatally with feline immunodeficiency virus. *J. Infect. Dis.* 184, 671–681.
- Cummins, J.M., Tompkins, M.B., Olsen, R.G., Tompkins, W.A., Lewis, M.G. (1988). Oral use of human alpha interferon in cats. *J Biol Response Mod* 7, 513–523.
- Dalton, D.K., Pitts-Meek, S., Keshav, S., Figari, I.S., Bradley, A., Stewart, T.A. (1993). Multiple defects of immune cell function in mice with disrupted interferon-gamma genes. *Science* 259, 1739–1742.
- de Mari, K., Maynard, L., Sanquer, A., Lebreux, B., Eun, H.-M. (2004). Therapeutic effects of recombinant feline interferon-omega on feline leukemia virus (FeLV)-infected and FeLV/feline immunodeficiency virus (FIV)-coinfected symptomatic cats. *J. Vet. Intern. Med.* 18, 477–482.
- de Milito, A. (2004). B lymphocyte dysfunctions in HIV infection. *Curr. HIV Res.* 2, 11–21.
- Decker, T., Kovarik, P., Meinke, A. (1997). GAS elements: a few nucleotides with a major impact on cytokine-induced gene expression. *J. Interferon Cytokine Res.* 17, 121–134.
- Decker, T., Müller, M., y Stockinger, S. (2005). The yin and yang of type I interferon activity in bacterial infection. *Nat. Rev. Immunol.* 5, 675–687.
- Devasthanam, A.S. (2014). Mechanisms underlying the inhibition of interferon signaling by viruses. *Virulence* 5, 270–277.
- Dianzani, F., Castilletti, C., Gentile, M., Gelderblom, H.R., Frezza, F., Capobianchi, M.R. (1998). Effects of IFN alpha on late stages of HIV-1 replication cycle. *Biochimie* 80, 745–754.
- Diehl, L.J., Hoover, E.A. (1992). Early and progressive helper T-cell dysfunction in feline leukemia virus-induced immunodeficiency. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* 5, 1188–1194.
- Diehl, L.J., Mathiason-Dubard, C.K., O'Neil, L.L., Obert, L.A., Hoover, E.A. (1995). Induction of accelerated feline immunodeficiency virus disease by acute-phase virus passage. *J. Virol.* 69, 6149–6157.
- Dinney, C.P., Bielenberg, D.R., Perrotte, P., Reich, R., Eve, B.Y., Bucana, C.D., Fidler, I.J. (1998). Inhibition of basic fibroblast growth factor expression, angiogenesis, and growth of human bladder carcinoma in mice by systemic interferon-alpha administration. *Cancer Res.* 58, 808–814.
- Domenech, A., Collado, V.M., Martin, S., y Gomez-Lucia, E. (2006). Patogenia de la leucemia y la inmunodeficiencia felinas. *Canis et Felis* 82, 36–64.

- Doménech, A., Miró, G., Collado, V.M., Ballesteros, N., Sanjosé, L., Escolar, E., Martín, S., Gomez-Lucia, E. (2011). Use of recombinant interferon omega in feline retrovirogenesis: from theory to practice. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 143, 301–306.
- Donnelly, R.P., Kotenko, S.V. (2010). Interferon-lambda: a new addition to an old family. *J. Interferon Cytokine Res.* 30, 555–564.
- Dow, S.W., Poss, M.L., Hoover, E.A. (1990). Feline immunodeficiency virus: a neurotropic lentivirus. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* 3, 658–668.
- Duarte, A., Tavares, L. (2006). Phylogenetic analysis of Portuguese Feline Immunodeficiency Virus sequences reveals high genetic diversity. *Vet. Microbiol.* 114, 25–33.
- Dunham, S.P. (2006). Lessons from the cat: development of vaccines against lentiviruses. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 112, 67–77.
- Dunham, S.P., Graham, E. (2008). Retroviral infections of small animals. *Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.* 38, 879–901, ix.
- Duthie, S., Eckersall, P.D., Addie, D.D., Lawrence, C.E., y Jarrett, O. (1997). Value of alpha 1-acid glycoprotein in the diagnosis of feline infectious peritonitis. *Vet. Rec.* 141, 299–303.
- Elder, J.H., Sundstrom, M., de Rozieres, S., de Parseval, A., Grant, C.K., Lin, Y.-C. (2008). Molecular mechanisms of FIV infection. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 123, 3–13.
- Ellis, J.A., Jackson, M.L., Bartsch, R.C., McGill, L.G., Martin, K.M., Trask, B.R., Haines, D.M. (1996). Use of immunohistochemistry and polymerase chain reaction for detection of oncornaviruses in formalin-fixed, paraffin-embedded fibrosarcomas from cats. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 209, 767–771.
- Endo, Y., Cho, K.W., Nishigaki, K., Momoi, Y., Nishimura, Y., Mizuno, T., Goto, Y., Watari, T., Tsujimoto, H., Hasegawa, A. (1997). Molecular characteristics of malignant lymphomas in cats naturally infected with feline immunodeficiency virus. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 57, 153–167.
- Endo-Munoz, L., Warby, T., Harrich, D., y McMillan, N.A.J. (2005). Phosphorylation of HIV Tat by PKR increases interaction with TAR RNA and enhances transcription. *Viol. J.* 2, 17.
- Engelman, R.W., Good, R.A., Day, N.K. (1987). Clearance of retroviremia and regression of malignancy in cats with leukemia-lymphoma during treatment with staphylococcal protein A. *Cancer Detect. Prev.* 10, 435–444.
- Escolar, E., Martín, S., Domenech, A., y Gómez-Lucía, E. (2006). Biopatología en la leucemia e inmunodeficiencia felinas. *Canis et Felis* 83, 7–19.
- Essex, M., Klein, G., Snyder, S.P., Harrold, J.B. (1971). Correlation between humoral antibody and regression of tumours induced by feline sarcoma virus. *Nature* 233, 195–196.
- Estaquier, J., Idziorek, T., de Bels, F., Barré-Sinoussi, F., Hurtrel, B., Aubertin, A.M., Venet, A., Mehtali, M., Muchmore, E., Michel, P., et al. (1994). Programmed cell death and AIDS: significance of T-cell apoptosis in pathogenic and nonpathogenic primate lentiviral infections. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91, 9431–9435.
- Eyster, M.E., Goedert, J.J., Poon, M.C., Preble, O.T. (1983). Acid-labile alpha interferon. A possible preclinical marker for the acquired immunodeficiency syndrome in hemophilia. *N. Engl. J. Med.* 309, 583–586.
- Feldman, S., Stein, D., Amrute, S., Denny, T., Garcia, Z., Kloser, P., Sun, Y., Megjugorac, N., Fitzgerald-Bocarsly, P. (2001). Decreased interferon-alpha production in HIV-infected patients correlates with numerical and functional deficiencies in circulating type 2 dendritic cell precursors. *Clin. Immunol.* 101, 201–210.
- Feng, X., Heyden, N.V., Ratner, L. (2003). Alpha interferon inhibits human T-cell leukemia virus type 1 assembly by preventing Gag interaction with rafts. *J. Virol.* 77, 13389–13395.
- Feng, X., Ratner, L. (2008). Human T-cell leukemia virus type 1 blunts signaling by interferon alpha. *Virology* 374, 210–216.
- Ferrantini, M., Capone, I., Belardelli, F. (2007). Interferon-alpha and cancer: mechanisms of action and new perspectives of clinical use. *Biochimie* 89, 884–893.
- Finke, J.S., Shodell, M., Shah, K., Siegal, F.P., Steinman, R.M. (2004). Dendritic cell numbers in the blood of HIV-1 infected patients before and after changes in antiretroviral therapy. *J. Clin. Immunol.* 24, 647–652.
- Fitzgerald-Bocarsly, P., y Feng, D. (2007). The role of type I interferon production by dendritic cells in host defense. *Biochimie* 89, 843–855.
- Flynn, J.N., Cannon, C.A., Lawrence, C.E., Jarrett, O. (1994). Polyclonal B-cell activation in cats infected with feline immunodeficiency virus. *Immunology* 81, 626–630.
- Flynn, J.N., Hanlon, L., Jarrett, O. (2000). Feline leukaemia virus: protective immunity is mediated by virus-specific cytotoxic T lymphocytes. *Immunology* 101, 120–125.

- Flynn, J.N., Dunham, S., Mueller, A., Cannon, C., Jarrett, O. (2002a). Involvement of cytolytic and non-cytolytic T cells in the control of feline immunodeficiency virus infection. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 85, 159–170.
- Flynn, J.N., Dunham, S.P., Watson, V., Jarrett, O. (2002b). Longitudinal analysis of feline leukemia virus-specific cytotoxic T lymphocytes: correlation with recovery from infection. *J. Virol.* 76, 2306–2315.
- François, C., Duverlie, G., Rebouillat, D., Khorsi, H., Castelain, S., Blum, H.E., Gatignol, A., Wychowski, C., Moradpour, D., y Meurs, E.F. (2000). Expression of hepatitis C virus proteins interferes with the antiviral action of interferon independently of PKR-mediated control of protein synthesis. *J. Virol.* 74, 5587–5596.
- Franklin, S.P., Troyer, J.L., Terwee, J.A., Lyren, L.M., Kays, R.W., Riley, S.P.D., Boyce, W.M., Crooks, K.R., Vandewoude, S. (2007a). Variability in assays used for detection of lentiviral infection in bobcats (*Lynx rufus*), pumas (*Puma concolor*), and ocelots (*Leopardus pardalis*). *J. Wildl. Dis.* 43, 700–710.
- Franklin, S.P., Troyer, J.L., Terwee, J.A., Lyren, L.M., Boyce, W.M., Riley, S.P.D., Roelke, M.E., Crooks, K.R., Vandewoude, S. (2007b). Frequent transmission of immunodeficiency viruses among bobcats and pumas. *J. Virol.* 81, 10961–10969.
- Frey, S.C., Hoover, E.A., Mullins, J.I. (2001). Feline immunodeficiency virus cell entry. *J. Virol.* 75, 5433–5440.
- Fujino, Y., Ohno, K., Tsujimoto, H. (2008). Molecular pathogenesis of feline leukemia virus-induced malignancies: insertional mutagenesis. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 123, 138–143.
- Gabriele, L., Ozato, K. (2007). The role of the interferon regulatory factor (IRF) family in dendritic cell development and function. *Cytokine Growth Factor Rev.* 18, 503–510.
- García, A. (1995). *Fisiología Veterinaria*. (Madrid: McGraw-Hill/Interamericana).
- García, J.C.S., Ariza, A.M., Lasa, A.M., González, L.J., Perez, V.B. (2007). Increased antiviral activity of microscale-purified HuIFN alpha 8 (human interferon alpha 8) over HuIFN alpha 2b in Hep-2 cells challenged with Mengo virus. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 48, 159–165.
- García, S., y Barneto, A. (2006). Cuadro clínico de las retrovirus felinas. *Canis et Felis* 83, 21–27.
- Gendelman, H.E., Baca, L.M., Turpin, J.A., Kalter, D.C., Dieffenbach, C., Friedman, R.M., Meltzer, M.S. (1990). Interactions between interferon and the human immunodeficiency virus. *J. Exp. Pathol.* 5, 53–67.
- Gerlach, N., Schimmer, S., Weiss, S., Kalinke, U., Dittmer, U. (2006). Effects of type I interferons on Friend retrovirus infection. *J. Virol.* 80, 3438–3444.
- Gessani, S., Conti, L., Del Cornò, M., y Belardelli, F. (2014). Type I interferons as regulators of human antigen presenting cell functions. *Toxins (Basel)* 6, 1696–1723.
- Giannecchini, S., Isola, P., Sichi, O., Matteucci, D., Pistello, M., Zaccaro, L., Del Mauro, D., Bendinelli, M. (2002). AIDS vaccination studies using an ex vivo feline immunodeficiency virus model: failure to protect and possible enhancement of challenge infection by four cell-based vaccines prepared with autologous lymphoblasts. *J. Virol.* 76, 6882–6892.
- Gibellini, F., Hunter, W.N., Smith, T.K. (2008). Biochemical characterization of the initial steps of the Kennedy pathway in *Trypanosoma brucei*: the ethanolamine and choline kinases. *Biochem. J.* 415, 135–144.
- Gil, S., Leal, R.O., Duarte, A., McGahie, D., Sepúlveda, N., Siborro, I., Cravo, J., Cartaxeiro, C., Tavares, L.M. (2013). Relevance of feline interferon omega for clinical improvement and reduction of concurrent viral excretion in retrovirus infected cats from a rescue shelter. *Res. Vet. Sci.* 94, 753–763.
- Gil, S., Leal, R.O., McGahie, D., Sepúlveda, N., Duarte, A., Niza, M.M.R.E., y Tavares, L. (2014). Oral Recombinant Feline Interferon-Omega as an alternative immune modulation therapy in FIV positive cats: clinical and laboratory evaluation. *Res. Vet. Sci.* 96, 79–85.
- Gleich, S.E., Krieger, S., and Hartmann, K. (2009). Prevalence of feline immunodeficiency virus and feline leukaemia virus among client-owned cats and risk factors for infection in Germany. *J. Feline Med. Surg.* 11, 985–992.
- Gobert, J.M., Remington, K.M., Zhu, Y.Q., North, T.W. (1994). Multiple-drug-resistant mutants of feline immunodeficiency virus selected with 2',3'-dideoxyinosine alone and in combination with 3'-azido-3'-deoxythymidine. *Antimicrob. Agents Chemother.* 38, 861–864.
- Gomes-Keller, M.A., Gönczi, E., Tandon, R., Riondato, F., Hofmann-Lehmann, R., Meli, M.L., Lutz, H. (2006a). Detection of feline leukemia virus RNA in saliva from naturally infected cats and correlation of PCR results with those of current diagnostic methods. *J. Clin. Microbiol.* 44, 916–922.
- Gomes-Keller, M.A., Tandon, R., Gönczi, E., Meli, M.L., Hofmann-Lehmann, R., Lutz, H. (2006b). Shedding of feline leukemia virus RNA in saliva is a consistent feature in viremic cats. *Vet. Microbiol.* 112, 11–21.

- Gómez, N.V., Fontanals, A., Castillo, V., Gisbert, M.A., Suraniti, A., Mira, G., y Pisano, P.B. (2012). Evaluation of different antiretroviral drug protocols on naturally infected feline immunodeficiency virus (FIV) cats in the late phase of the asymptomatic stage of infection. *Viruses* 4, 924-939.
- Gómez-Lucía, E., Tejerizo, G., Escolar, E., y Domenech, A. (2006). Etiología de la leucemia y de la inmunodeficiencia felinas. *Canis et Felis* 85, 5-18.
- Gómez-Lucía, E., Collado, V.M., Miró, G., y Doménech, A. (2009). Effect of type-I interferon on retroviruses. *Viruses* 1, 545-573.
- Goncalves, J., Shi, B., Yang, X., Gabuzda, D. (1995). Biological activity of human immunodeficiency virus type 1 Vif requires membrane targeting by C-terminal basic domains. *J. Virol.* 69, 7196-7204.
- Goodbourn, S., Didcock, L., Randall, R.E. (2000). Interferons: cell signalling, immune modulation, antiviral response and virus countermeasures. *J. Gen. Virol.* 81, 2341-2364.
- Goto, Y., Nishimura, Y., Mizuno, T., Endo, Y., Baba, K., Momoi, Y., Watari, T., Hasegawa, A., Tsujimoto, H. (2000). Quantification of viral ribonucleic acid in plasma of cats naturally infected with feline immunodeficiency virus. *Am. J. Vet. Res.* 61, 1609-1613.
- Goto, Y., Nishimura, Y., Baba, K., Mizuno, T., Endo, Y., Masuda, K., Ohno, K., Tsujimoto, H. (2002). Association of plasma viral RNA load with prognosis in cats naturally infected with feline immunodeficiency virus. *J. Virol.* 76, 10079-10083.
- Grant, C.K., Pickard, D.K., Ramaika, C., Madewell, B.R., Essex, M. (1979). Complement and tumor antibody levels in cats, and changes associated with natural feline leukemia virus infection and malignant disease. *Cancer Res.* 39, 75-81.
- Greene, W.C. (1993). AIDS and the immune system. *Sci. Am.* 269, 98-105.
- Haller, O., Kochs, G., Weber, F. (2006). The interferon response circuit: induction and suppression by pathogenic viruses. *Virology* 344, 119-130.
- Haller, O., Kochs, G. (2011). Human MxA protein: an interferon-induced dynamin-like GTPase with broad antiviral activity. *J. Interferon Cytokine Res.* 31, 79-87.
- Hanlon, L., Argyle, D., Bain, D., Nicolson, L., Dunham, S., Golder, M.C., McDonald, M., McGillivray, C., Jarrett, O., Neil, J.C., et al. (2001). Feline leukemia virus DNA vaccine efficacy is enhanced by coadministration with interleukin-12 (IL-12) and IL-18 expression vectors. *J. Virol.* 75, 8424-8433.
- Hansen, B.D., Nara, P.L., Maheshwari, R.K., Sidhu, G.S., Bernbaum, J.G., Hoekzema, D., Meltzer, M.S., Gendelman, H.E. (1992). Loss of infectivity by progeny virus from alpha interferon-treated human immunodeficiency virus type 1-infected T cells is associated with defective assembly of envelope gp120. *J. Virol.* 66, 7543-7548.
- Hardy, W.D., Essex, M. (1986). FeLV-induced feline acquired immune deficiency syndrome. A model for human AIDS. *Prog Allergy* 37, 353-376.
- Hart, S., Nolte, I. (1995). Long-term treatment of diseased, FIV-seropositive field cats with azidothymidine (AZT). *Zentralbl Veterinarmed A* 42, 397-409.
- Hartmann, K. (2008). Infección por virus de leucemia felina. In *Enfermedades Infecciosas Del Perro Y El Gato*, (Ciudad Autónoma de Buenos Aires: Editorial Inter-Médica S.A.I.C.I.), pp. 116-145.
- Hartmann, K. (2012). Antiviral and Immunomodulatory Chemotherapy. In *Infectious Diseases of the dog and cat*, (Elsevier: Editorial Saunders), pp. 10-24.
- Hartmann, K., Block, A., Ferk, G., Vollmar, A., Goldberg, M., Lutz, H. (1998a). Treatment of feline leukemia virus-infected cats with paramunity inducer. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 65, 267-275.
- Hartmann, K., Gerle, K., Leutenegger, C. (1998b). Feline leukemia virus—most important oncogene in cats? In *Abstracts from the 4th International Fel Ine Retrovirus Reseach Symposium*, (Scotland, UK), p. 39.
- Hartmann, K., Brunner, K., Lutz, H. (2002). Treatment of feline leukemia virus infection with 3-azido-2,3-dideoxythymidine and human alpha-interferon. In *In Proceedings of the 20th Annual Conference, American College of Veterinary Internal Medicine*, (Dallas), p. 799.
- Hartmann, K., Griessmayr, P., Schulz, B., Greene, C.E., Vidyashankar, A.N., Jarrett, O., Egberink, H.F. (2007). Quality of different in-clinic test systems for feline immunodeficiency virus and feline leukaemia virus infection. *J. Feline Med. Surg.* 9, 439-445.
- Hartmann, K. (2012). Clinical aspects of feline retroviruses: a review. *Viruses* 4, 2684-2710.
- Hartmann, K., Day, M.J., Thiry, E., Lloret, A., Frymus, T., Addie, D., Boucraut-Baralon, C., Egberink, H., Gruffydd-Jones, T., Horzinek, M.C., et al. (2015). Feline injection-site sarcoma: ABCD guidelines on prevention and management. *J. Feline Med. Surg.* 17, 606-613.

- Hayes, K.A., Rojko, J.L., Mathes, L.E. (1992). Incidence of localized feline leukemia virus infection in cats. *Am. J. Vet. Res.* 53, 604–607.
- Hein, A., Martin, J.P., Koehren, F., Bingen, A., Dörries, R. (2000). *In vivo* infection of ramified microglia from adult cat central nervous system by feline immunodeficiency virus. *Virology* 268, 420–429.
- Hein, A., Martin, J.-P., Dörries, R. (2005). Early pathological changes in the central nervous system of acutely feline-immunodeficiency-virus-infected cats. *Virology* 343, 162–170.
- Hennet, P.R., Camy, G.A.L., McGahie, D.M., y Albouy, M.V. (2011). Comparative efficacy of a recombinant feline interferon omega in refractory cases of calicivirus-positive cats with caudal stomatitis: a randomised, multi-centre, controlled, double-blind study in 39 cats. *J. Feline Med. Surg.* 13, 577–587.
- Herbeuval, J.-P., Grivel, J.-C., Boasso, A., Hardy, A.W., Chougnet, C., Dolan, M.J., Yagita, H., Lifson, J.D., Shearer, G.M. (2005). CD4+ T-cell death induced by infectious and noninfectious HIV-1: role of type 1 interferon-dependent, TRAIL/DR5-mediated apoptosis. *Blood* 106, 3524–3531.
- Herbeuval, J.-P., Nilsson, J., Boasso, A., Hardy, A.W., Kruhlak, M.J., erson, S.A., Dolan, M.J., Dy, M., Andersson, J., Shearer, G.M. (2006). Differential expression of IFN-alpha and TRAIL/DR5 in lymphoid tissue of progressor versus nonprogressor HIV-1-infected patients. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103, 7000–7005.
- Herbeuval, J.-P., Shearer, G.M. (2007). HIV-1 immunopathogenesis: how good interferon turns bad. *Clin. Immunol.* 123, 121–128.
- Herring, I.P., Troy, G.C., Toth, T.E., Champagne, E.S., Pickett, J.P., Haines, D.M. (2001). Feline leukemia virus detection in corneal tissues of cats by polymerase chain reaction and immunohistochemistry. *Vet Ophthalmol* 4, 119–126.
- Hisasue, M., Okayama, H., Okayama, T., Suzuki, T., Mizuno, T., Fujino, Y., Naganobu, K., Hasegawa, A., Watari, T., Matsuki, N., et al. (2001). Hematologic abnormalities and outcome of 16 cats with myelodysplastic syndromes. *J. Vet. Intern. Med.* 15, 471–477.
- Hoffmann-Fezer, G., Mortelbauer, W., Hartmann, K., Mysliwicz, J., Thefeld, S., Beer, B., Thum, I., Kraft, W. (1996). Comparison of T-cell subpopulations in cats naturally infected with feline leukaemia virus or feline immunodeficiency virus. *Res. Vet. Sci.* 61, 222–226.
- Hoffmann-Jagielska, M., Winnicka, A., Jagielski, D., Micuń, J., Zmudzka, M., Lechowski, R. (2005). Influence of naturally acquired feline leukemia virus (FeLV) infection on the phagocytic and respiratory burst activity of neutrophils and monocytes of peripheral blood. *Pol J Vet Sci* 8, 93–97.
- Hofmann-Lehmann, R., Holznagel, E., Ossent, P., Lutz, H. (1997). Parameters of disease progression in long-term experimental feline retrovirus (feline immunodeficiency virus and feline leukemia virus) infections: hematology, clinical chemistry, and lymphocyte subsets. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 4, 33–42.
- Hofmann-Lehmann, R., Huder, J.B., Gruber, S., Boretti, F., Sigrist, B., Lutz, H. (2001). Feline leukaemia provirus load during the course of experimental infection and in naturally infected cats. *J. Gen. Virol.* 82, 1589–1596.
- Hofmann-Lehmann, R., Tandon, R., Boretti, F.S., Meli, M.L., Willi, B., Cattori, V., Gomes-Keller, M.A., Ossent, P., Golder, M.C., Flynn, J.N., et al. (2006). Reassessment of feline leukaemia virus (FeLV) vaccines with novel sensitive molecular assays. *Vaccine* 24, 1087–1094.
- Hofmann-Lehmann, R., Cattori, V., Tandon, R., Boretti, F.S., Meli, M.L., Riond, B., Lutz, H. (2008). How molecular methods change our views of FeLV infection and vaccination. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 123, 119–123.
- Holznagel, E., Hofmann-Lehmann, R., Leutenegger, C.M., Allenspach, K., Huettner, S., Forster, U., Niederer, E., Joller, H., Willett, B.J., Hummel, U., et al. (1998). The role of *in vitro*-induced lymphocyte apoptosis in feline immunodeficiency virus infection: correlation with different markers of disease progression. *J. Virol.* 72, 9025–9033.
- Honda, K., Ohba, Y., Yanai, H., Negishi, H., Mizutani, T., Takaoka, A., Taya, C., Taniguchi, T. (2005a). Spatiotemporal regulation of MyD88-IRF-7 signalling for robust type-I interferon induction. *Nature* 434, 1035–1040.
- Honda, K., Yanai, H., Negishi, H., Asagiri, M., Sato, M., Mizutani, T., Shimada, N., Ohba, Y., Takaoka, A., Yoshida, N., et al. (2005b). IRF-7 is the master regulator of type-I interferon-dependent immune responses. *Nature* 434, 772–777.
- Hoover, E.A., Olsen, R.G., Hardy, W.D., Schaller, J.P. (1977). Horizontal transmission of feline leukemia virus under experimental conditions. *J. Natl. Cancer Inst.* 58, 443–444.
- Hoover, E.A., Mullins, J.I. (1991). Feline leukemia virus infection and diseases. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 199, 1287–1297.
- Hopper, C.D., Sparkes, A.H., Gruffydd-Jones, T.J., Crispin, S.M., Muir, P., Harbour, D.A., Stokes, C.R. (1989). Clinical and laboratory findings in cats infected with feline immunodeficiency virus. *Vet. Rec.* 125, 341–346.
- Hörber, D., Mayr, B. (1991). [Paramunization of FeLV-positive cats with PIND-AVI]. *Tierarztl Prax* 19, 311–314.

- Horn, C. (1978). [Optimal dental radiography by means of expert film processing]. *Stomatol DDR* 28, 739–746.
- Hosie, M.J., Addie, D., Belák, S., Boucraut-Baralon, C., Egberink, H., Frymus, T., Gruffydd-Jones, T., Hartmann, K., Lloret, A., Lutz, H., et al. (2009). Feline immunodeficiency. ABCD guidelines on prevention and management. *J. Feline Med. Surg.* 11, 575–584.
- Huitron-Resendiz, S., De Rozières, S., Sanchez-Alavez, M., Bühler, B., Lin, Y.-C., Lerner, D.L., Henriksen, N.W., Burudi, M., Fox, H.S., Torbett, B.E., et al. (2004). Resolution and prevention of feline immunodeficiency virus-induced neurological deficits by treatment with the protease inhibitor TL-3. *J. Virol.* 78, 4525–4532.
- Imbeault, M., Ouellet, M., Tremblay, M.J. (2009). Microarray study reveals that HIV-1 induces rapid type-I interferon-dependent p53 mRNA up-regulation in human primary CD4+ T cells. *Retrovirology* 6, 5.
- Inoshima, Y., Ikeda, Y., Kohmoto, M., Pecoraro, M.R., Shimojima, M., Shimojima, Y., Inada, G., Kawaguchi, Y., Tomonaga, K., Miyazawa, T., et al. (1996). Persistence of high virus neutralizing antibody titers in cats experimentally infected with feline immunodeficiency virus. *J. Vet. Med. Sci.* 58, 925–927.
- Isaacs, A., Lindenmann, J. (1957). Virus interference. I. The interferon. *Proc. R. Soc. Lond., B, Biol. Sci.* 147, 258–267.
- Ishida, T., Washizu, T., Toriyabe, K., Motoyoshi, S., Tomoda, I., Pedersen, N.C. (1989). Feline immunodeficiency virus infection in cats of Japan. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 194, 221–225.
- Ivashkiv, L.B., y Donlin, L.T. (2014). Regulation of type I interferon responses. *Nat. Rev. Immunol.* 14, 36–49.
- Iwasaki, A. (2012). A virological view of innate immune recognition. *Annu. Rev. Microbiol.* 66, 177–196.
- Izawa, J.I., Sweeney, P., Perrotte, P., Kedar, D., Dong, Z., Slaton, J.W., Karashima, T., Inoue, K., Benedict, W.F., Dinney, C.P.N. (2002). Inhibition of tumorigenicity and metastasis of human bladder cancer growing in athymic mice by interferon-beta gene therapy results partially from various antiangiogenic effects including endothelial cell apoptosis. *Clin. Cancer Res.* 8, 1258–1270.
- Jackson, M.L., Haines, D.M., Taylor, S.M., Misra, V. (1996). Feline leukemia virus detection by ELISA and PCR in peripheral blood from 68 cats with high, moderate, or low suspicion of having FeLV-related disease. *J. Vet. Diagn. Invest.* 8, 25–30.
- Jameson, P., y Essex, M. (1983). Inhibition of feline leukemia virus replication by human leukocyte interferon. *Antiviral Res.* 3, 115–120.
- Janeway, C.A. (1990). Self superantigens? *Cell* 63, 659–661.
- Janossy, G., y Shapiro, H. (2008). Simplified cytometry for routine monitoring of infectious diseases. *Cytometry B Clin Cytom* 74 Suppl 1, S6–S10.
- Jarrett, W.F., Crawford, E.M., Martin, W.B., Davie, F. (1964a). A virus-like particle associated with leukemia (lymphosarcoma). *Nature* 202, 567–569.
- Jarrett, W.F., Martin, W.B., Crichton, G.W., Dalton, R.G., Stewart, M.F. (1964b). Transmission experiments with leukemia (lymphosarcoma). *Nature* 202, 566–567.
- Jarrett, O., Pacitti, A.M., Hosie, M.J., Reid, G. (1991). Comparison of diagnostic methods for feline leukemia virus and feline immunodeficiency virus. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 199, 1362–1364.
- Jarrett, O. (1995). Detection of FeLV antigen. *Vet. Rec.* 137, 127.
- Jarrett, O., Ganière, J.P. (1996). Comparative studies of the efficacy of a recombinant feline leukaemia virus vaccine. *Vet. Rec.* 138, 7–11.
- Jarrett, O. (1999). Strategies of retrovirus survival in the cat. *Vet. Microbiol.* 69, 99–107.
- Jelínek, F. (2003). Postinflammatory sarcoma in cats. *Exp. Toxicol. Pathol.* 55, 167–172.
- Jordan, H.L., Howard, J., Barr, M.C., Kennedy-Stoskopf, S., Levy, J.K., Tompkins, W.A. (1998a). Feline immunodeficiency virus is shed in semen from experimentally and naturally infected cats. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 14, 1087–1092.
- Jordan, H.L., Howard, J.G., Bucci, J.G., Butterworth, J.L., English, R., Kennedy-Stoskopf, S., Tompkins, M.B., Tompkins, W.A. (1998b). Horizontal transmission of feline immunodeficiency virus with semen from seropositive cats. *J. Reprod. Immunol.* 41, 341–357.
- Juste, R.A., Ott, T.L., Kwang, J., Bazer, F.W., de la Concha-Bermejillo, A. (1996). Effects of recombinant interferon-tau on ovine lentivirus replication. *J. Interferon Cytokine Res.* 16, 989–994.
- Karpov, A.V. (2001). Endogenous and exogenous interferons in HIV-infection. *Eur. J. Med. Res.* 6, 507–524.
- Kawai, T., Akira, S. (2011). Toll-like receptors and their crosstalk with other innate receptors in infection and immunity. *Immunity* 34, 637–650.

- Keir, M.E., Rosenberg, M.G., Sandberg, J.K., Jordan, K.A., Wiznia, A., Nixon, D.F., Stoddart, C.A., McCune, J.M. (2002a). Generation of CD3+CD8low thymocytes in the HIV type 1-infected thymus. *J. Immunol.* 169, 2788–2796.
- Keir, M.E., Stoddart, C.A., Linquist-Stepps, V., Moreno, M.E., McCune, J.M. (2002b). IFN- α secretion by type 2 predendritic cells up-regulates MHC class I in the HIV-1-infected thymus. *J. Immunol.* 168, 325–331.
- Kiermer, V., Van Lint, C., Briclet, D., Vanhulle, C., Kettmann, R., Verdin, E., Burny, A., Droogmans, L. (1998). An interferon regulatory factor binding site in the U5 region of the bovine leukemia virus long terminal repeat stimulates Tax-independent gene expression. *J. Virol.* 72, 5526–5534.
- Kinpara, S., Hasegawa, A., Utsunomiya, A., Nishitsuji, H., Furukawa, H., Masuda, T., Kannagi, M. (2009). Stromal cell-mediated suppression of human T-cell leukemia virus type 1 expression *in vitro* and *in vivo* by type I interferon. *J. Virol.* 83, 5101–5108.
- Kipar, A., Kremendahl, J., Jackson, M.L., Reinacher, M. (2001). Comparative examination of cats with feline leukemia virus-associated enteritis and other relevant forms of feline enteritis. *Vet. Pathol.* 38, 359–371.
- Kirpensteijn, J. (2006). Feline injection site-associated sarcoma: Is it a reason to critically evaluate our vaccination policies? *Vet. Microbiol.* 117, 59–65.
- Kleinerman, E.S., Kurzrock, R., Wyatt, D., Quesada, J.R., Gutterman, J.U., Fidler, I.J. (1986). Activation or suppression of the tumoricidal properties of monocytes from cancer patients following treatment with human recombinant gamma-interferon. *Cancer Res.* 46, 5401–5405.
- Köbl, S., Skolek, R., Hirt, R., Seiser, M., Thalhammer, J. (2000). Effects of long term low dose interferon alpha in cats persistently infected with FeLV. *Kleintierpraxis* 45, 497–510.
- Kociba, G.J., Halper, J.M. (1987). Demonstration of retroviral proteins associated with erythroid progenitors of cats with feline leukemia virus-induced erythroid aplasia. *Leuk. Res.* 11, 1135–1140.
- Kociba, G.J., Garg, R.C., Khan, K.N.M., Reiter, J.A., Chatfield, R.C. (1995). Effects of orally administered interferon- α on the pathogenesis of feline leukaemia virus-induced erythroid aplasia. *Comparative Haematology International* 5, 79–83.
- Koech, D.K., Obel, A.O. (1990). Efficacy of Kemron (low dose oral natural human interferon alpha) in the management of HIV-1 infection and acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *East Afr Med J* 67, SS64–SS70.
- Künzi, M.S., Farzadegan, H., Margolick, J.B., Vlahov, D., y Pitha, P.M. (1995). Identification of human immunodeficiency virus primary isolates resistant to interferon-alpha and correlation of prevalence to disease progression. *J. Infect. Dis.* 171, 822–828.
- Kusuhara, H., Hohdatsu, T., Okumura, M., Sato, K., Suzuki, Y., Motokawa, K., Gemma, T., Watanabe, R., Huang, C., Arai, S., et al. (2005). Dual-subtype vaccine (Fel-O-Vax FIV) protects cats against contact challenge with heterologous subtype B FIV infected cats. *Vet. Microbiol.* 108, 155–165.
- LaCasse, R.A., Remington, K.M., North, T.W. (1996). The mutation frequency of feline immunodeficiency virus enhanced by 3'-azido-3'-deoxythymidine. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr. Hum. Retrovirol.* 12, 26–32.
- Lafrado, L.J., Mathes, L.E., Olsen, R.G. (1986). Evaluation of terminal deoxynucleotidyl transferase expression in bone marrow of clinically normal and feline leukemia virus-exposed cats. *Am. J. Vet. Res.* 47, 820–821.
- Lafrado, L.J., Olsen, R.G. (1986). Demonstration of depressed polymorphonuclear leukocyte function in nonviremic FeLV-infected cats. *Cancer Invest.* 4, 297–300.
- Lafrado, L.J., Lewis, M.G., Mathes, L.E., Olsen, R.G. (1987). Suppression of *in vitro* neutrophil function by feline leukaemia virus (FeLV) and purified FeLV-p15E. *J. Gen. Virol.* 68 (Pt 2), 507–513.
- Langhammer, S., Fiebig, U., Kurth, R., Denner, J. (2005). Neutralising antibodies against the transmembrane protein of feline leukaemia virus (FeLV). *Vaccine* 23, 3341–3348.
- Langhammer, S., Hübner, J., Kurth, R., Denner, J. (2006). Antibodies neutralizing feline leukaemia virus (FeLV) in cats immunized with the transmembrane envelope protein p15E. *Immunology* 117, 229–237.
- Lauring, A.S., Anderson, M.M., Overbaugh, J. (2001). Specificity in receptor usage by T-cell-tropic feline leukemia viruses: implications for the *in vivo* tropism of immunodeficiency-inducing variants. *J. Virol.* 75, 8888–8898.
- Leal, R.O., Gil, S., Brito, M.T., McGahie, D., Niza, M.M., y Tavares, L. (2013). The use of oral recombinant feline interferon omega in two cats with type II diabetes mellitus and concurrent feline chronic gingivostomatitis syndrome. *Ir Vet J* 66, 19.
- Leal, R.O., Gil, S., Sepúlveda, N., McGahie, D., Duarte, A., Niza, M.M.R.E., Tavares, L. (2014). Monitoring acute phase proteins in retrovirus infected cats undergoing feline interferon- ω therapy. *J Small Anim Pract* 55, 39–45.

- Leal, R.O., Gil, S., Duarte, A., McGahie, D., Sepúlveda, N., Niza, M.M.R.E., y Tavares, L. (2015). Evaluation of viremia, proviral load and cytokine profile in naturally feline immunodeficiency virus infected cats treated with two different protocols of recombinant feline interferon omega. *Res. Vet. Sci.* 99, 87–95.
- Lee, I.T., Levy, J.K., Gorman, S.P., Crawford, P.C., Slater, M.R. (2002). Prevalence of feline leukemia virus infection and serum antibodies against feline immunodeficiency virus in unowned free-roaming cats. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 220, 620–622.
- Lehmann, R., Franchini, M., Aubert, A., Wolfensberger, C., Cronier, J., y Lutz, H. (1991). Vaccination of cats experimentally infected with feline immunodeficiency virus, using a recombinant feline leukemia virus vaccine. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 199, 1446–1452.
- Lerner, D.L., Grant, C.K., de Parseval, A., Elder, J.H. (1998). FIV infection of IL-2-dependent and -independent feline lymphocyte lines: host cells range distinctions and specific cytokine upregulation. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 65, 277–297.
- Lerner, D.L., Elder, J.H. (2000). Expanded host cell tropism and cytopathic properties of feline immunodeficiency virus strain PPR subsequent to passage through interleukin-2-independent T cells. *J. Virol.* 74, 1854–1863.
- Leutenegger, C.M., Hofmann-Lehmann, R., Riols, C., Liberek, M., Worel, G., Lups, P., Fehr, D., Hartmann, M., Weilenmann, P., Lutz, H. (1999a). Viral infections in free-living populations of the European wildcat. *J. Wildl. Dis.* 35, 678–686.
- Leutenegger, C.M., Klein, D., Hofmann-Lehmann, R., Mislin, C., Hummel, U., Böni, J., Boretti, F., Guenzburg, W.H., Lutz, H. (1999b). Rapid feline immunodeficiency virus provirus quantitation by polymerase chain reaction using the TaqMan fluorogenic real-time detection system. *J. Virol. Methods* 78, 105–116.
- Levy, J.K., Ritchey, J.W., Rottman, J.B., Davidson, M.G., Liang, Y.H., Jordan, H.L., Tompkins, W.A., Tompkins, M.B. (1998). Elevated interleukin-10-to-interleukin-12 ratio in feline immunodeficiency virus-infected cats predicts loss of type 1 immunity to *Toxoplasma gondii*. *J. Infect. Dis.* 178, 503–511.
- Levy, D.E. (1999). Physiological significance of STAT proteins: investigations through gene disruption *in vivo*. *Cell. Mol. Life Sci.* 55, 1559–1567.
- Levy, J.K. (2000). FeLV and non-neoplastic FeLV-related disease. In *Textbook of Veterinary Internal Medicine.*, (Philadelphia, PA: WB Saunders), pp. 424–432.
- Levy, D.E., Darnell, J.E. (2002). Stats: transcriptional control and biological impact. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 3, 651–662.
- Levy, J.K., Crawford, P.C. (2004). Humane strategies for controlling feral cat populations. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 225, 1354–1360.
- Levy, J.K., Crawford, P.C., Slater, M.R. (2004). Effect of vaccination against feline immunodeficiency virus on results of serologic testing in cats. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 225, 1558–1561.
- Levy, L.S. (2008). Advances in understanding molecular determinants in FeLV pathology. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 123, 14–22.
- Levy, J., Crawford, C., Hartmann, K., Hofmann-Lehmann, R., Little, S., Sundahl, E., Thayer, V. (2008a). 2008 American Association of Feline Practitioners' feline retrovirus management guidelines. *J. Feline Med. Surg.* 10, 300–316.
- Levy, J.K., Crawford, P.C., Kusuhara, H., Motokawa, K., Gemma, T., Watanabe, R., Arai, S., Bienzle, D., Hohdatsu, T. (2008b). Differentiation of feline immunodeficiency virus vaccination, infection, or vaccination and infection in cats. *J. Vet. Intern. Med.* 22, 330–334.
- Levy, J., Crawford, C., Hartmann, K., Hoffmann-Lehmann, R., Little, S., Sundahl, E., Thayer, V., American Association of Feline Practitioners (2009). 2008 Feline retrovirus management guidelines. *Compend Contin Educ Vet* 31, E10.
- Liang, Y., Hudson, L.C., Levy, J.K., Ritchey, J.W., Tompkins, W.A., Tompkins, M.B. (2000). T cells overexpressing interferon-gamma and interleukin-10 are found in both the thymus and secondary lymphoid tissues of feline immunodeficiency virus-infected cats. *J. Infect. Dis.* 181, 564–575.
- Lidman, C., Magnus, L., Norder, H., y Weiland, O. (1993). Interferon alpha-2b treatment in an HIV-infected patient with hepatitis B virus induced nephrotic syndrome. *Scand. J. Infect. Dis.* 25, 133–135.
- Lindner, D.J. (2002). Interferons as antiangiogenic agents. *Curr Oncol Rep* 4, 510–514.
- Little, S., Sears, W., Lachtara, J., Bienzle, D. (2009). Seroprevalence of feline leukemia virus and feline immunodeficiency virus infection among cats in Canada. *Can. Vet. J.* 50, 644–648.
- Little, S., Bienzle, D., Carioto, L., Chisholm, H., O'Brien, E., Scherk, M. (2011). Feline leukemia virus and feline immunodeficiency virus in Canada: recommendations for testing and management. *Can. Vet. J.* 52, 849–855.

- Liu, B., Wang, Y., Hao, C., Liu, Y., Qian, L. (2001). [Observation of long-term therapeutic outcome in chronic granulocytic leukemia]. *Zhonghua Xue Ye Xue Za Zhi* 22, 61–63.
- Liu, C.J., Wang, H., y Lengyel, P. (1999). The interferon-inducible nucleolar p204 protein binds the ribosomal RNA-specific UBF1 transcription factor and inhibits ribosomal RNA transcription. *EMBO J.* 18, 2845–2854.
- Louwerens, M., London, C.A., Pedersen, N.C., Lyons, L.A. (2005). Feline lymphoma in the post-feline leukemia virus era. *J. Vet. Intern. Med.* 19, 329–335.
- Luaces, I., Doménech, A., García-Montijano, M., Collado, V.M., Sánchez, C., Tejerizo, J.G., Galka, M., Fernández, P., Gómez-Lucía, E. (2008). Detection of Feline leukemia virus in the endangered Iberian lynx (*Lynx pardinus*). *J. Vet. Diagn. Invest.* 20, 381–385.
- Lutz, H., Addie, D., Belák, S., Boucraut-Baralon, C., Egberink, H., Frymus, T., Gruffydd-Jones, T., Hartmann, K., Hosie, M.J., Lloret, A., et al. (2009). Feline leukaemia. ABCD guidelines on prevention and management. *J. Feline Med. Surg.* 11, 565–574.
- MacDonald, K., Levy, J.K., Tucker, S.J., Crawford, P.C. (2004). Effects of passive transfer of immunity on results of diagnostic tests for antibodies against feline immunodeficiency virus in kittens born to vaccinated queens. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 225, 1554–1557.
- Mackey, L., Jarrett, W., Jarrett, O., Laird, H. (1975). Anemia associated with feline leukemia virus infection in cats. *J. Natl. Cancer Inst.* 54, 209–217.
- Maelfait, J., Beyaert, R. (2012). Emerging role of ubiquitination in antiviral RIG-I signaling. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 76, 33–45.
- Mahony, O.M., Moore, A.S., Cotter, S.M., Engler, S.J., Brown, D., Penninck, D.G. (1995). Alimentary lymphoma in cats: 28 cases (1988-1993). *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 207, 1593–1598.
- Mandell, C.P.; Sparger, E.E., Pedersen, N.C. y Jain, N.C. (1992) Long-term haematological changes in cats experimentally infected with feline immunodeficiency virus (FIV). *Comparative Haematology Internacional.* 2, 8-17
- Mangino, G., Percario, Z.A., Fiorucci, G., Vaccari, G., Manrique, S., Romeo, G., Federico, M., Geyer, M., Affabris, E. (2007). *In vitro* treatment of human monocytes/macrophages with myristoylated recombinant Nef of human immunodeficiency virus type 1 leads to the activation of mitogen-activated protein kinases, I κ B kinases, and interferon regulatory factor 3 and to the release of beta interferon. *J. Virol.* 81, 2777–2791.
- Marchetti, G., Gori, A., Casabianca, A., Magnani, M., Franzetti, F., Clerici, M., Perno, C.-F., Monforte, A. d'Arminio, Galli, M., y Meroni, L. (2006). Comparative analysis of T-cell turnover and homeostatic parameters in HIV-infected patients with discordant immune-virological responses to HAART. *AIDS* 20, 1727–1736.
- Marsili, G., Borsetti, A., Sgarbanti, M., Remoli, A.L., Ridolfi, B., Stellacci, E., Ensoli, B., Battistini, A. (2003). On the role of interferon regulatory factors in HIV-1 replication. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1010, 29–42.
- Mathes, L.E., Pandey, R., Chakrabarti, R., Hofman, F.M., Hayes, K.A., Stromberg, P., Roy-Burman, P. (1994). Pathogenicity of a subgroup C feline leukemia virus (FeLV) is augmented when administered in association with certain FeLV recombinants. *Virology* 198, 185–195.
- Matsumoto, H., Takemura, N., Sako, T., Koyama, H., Motoyoshi, S., y Inada, Y. (1997). Serum concentration of circulating immune complexes in cats infected with feline immunodeficiency virus detected by immune adherence hemagglutination method. *J. Vet. Med. Sci.* 59, 395–396.
- Maynard, L., de Mari, K., Lebreux, B. (2000). Efficacy of a recombinant feline omega interferon in the treatment of symptomatic FeLV- or FeLV- and FIV-positive cats. In *Proceedings of the 10th Congress, European Society of Veterinary InternalMedicine*, (Neuchâtel, Switzerland), p. 122.
- McCaw, D.L., Boon, G.D., Jergens, A.E., Kern, M.R., Bowles, M.H., Johnson, J.C. (2001). Immunomodulation therapy for feline leukemia virus infection. *J Am Anim Hosp Assoc* 37, 356–363.
- McCoubrie, J.E., Kendrick, T.S., Minchin, R.F. (2004). HIV LTR-dependent expression of Bax selectively induces apoptosis in Tat-positive cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 325, 1459–1464.
- Medlin, H.K., Zhu, Y.Q., Remington, K.M., Phillips, T.R., North, T.W. (1996). Selection and characterization of a mutant of feline immunodeficiency virus resistant to 2',3'-dideoxycytidine. *Antimicrob. Agents Chemother.* 40, 953–957.
- Mendoza, R., Anderson, M.M., Overbaugh, J. (2006). A putative thiamine transport protein is a receptor for feline leukemia virus subgroup A. *J. Virol.* 80, 3378–3385.
- Mexas, A.M., Fogle, J.E., Tompkins, W.A., y Tompkins, M.B. (2008). CD4+CD25+ regulatory T cells are infected and activated during acute FIV infection. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 126, 263–272.

- Miró, G., Doménech, A., Escolar, E., Collado, V.M., Tejerizo, G., De Las Heras, A., Gómez-Lucía, E. (2007). Plasma electrophoretogram in feline immunodeficiency virus (FIV) and/or feline leukaemia virus (FeLV) infections. *J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med* 54, 203–209.
- Miyazawa, T., Jarrett, O. (1997). Feline leukaemia virus proviral DNA detected by polymerase chain reaction in antigenaemic but non-viraemic ('discordant') cats. *Arch. Virol.* 142, 323–332.
- Mizuno, T., Goto, Y., Baba, K., Momoi, Y., Endo, Y., Nishimura, Y., Masuda, K., Ohno, K., y Tsujimoto, H. (2003). Quantitative analysis of Fas and Fas ligand mRNAs in a feline T-lymphoid cell line after infection with feline immunodeficiency virus and primary peripheral blood mononuclear cells obtained from cats infected with the virus. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 93, 117–123.
- Murphy, F., Gibbs, E., Horzinek, M., Studdert, M. (1999). Retroviridae. In *Veterinary Virology*, (San Diego: Ed. Academic Press), pp. 363–389.
- Natoli, E., Say, L., Cafazzo, S., Bonanni, R., Schmid, M., Pontier, D. (2005). Bold attitude makes male urban feral domestic cats more vulnerable to Feline Immunodeficiency Virus. *Neurosci Biobehav Rev* 29, 151–157.
- Niermann, G.L., y Buehring, G.C. (1997). Hormone regulation of bovine leukemia virus via the long terminal repeat. *Virology* 239, 249–258.
- Nishigaki, K., Okuda, M., Endo, Y., Watari, T., Tsujimoto, H., Hasegawa, A. (1997). Structure and function of the long terminal repeats of feline leukemia viruses derived from naturally occurring acute myeloid leukemias in cats. *J. Virol.* 71, 9823–9827.
- Nishimura, Y., Goto, Y., Yoneda, K., Endo, Y., Mizuno, T., Hamachi, M., Maruyama, H., Kinoshita, H., Koga, S., Komori, M., et al. (1999). Interspecies transmission of feline immunodeficiency virus from the domestic cat to the Tsushima cat (*Felis bengalensis euphilura*) in the wild. *J. Virol.* 73, 7916–7921.
- Norsworthy, G. (1993). Feline leukemia virus diseases. In *Feline Practice*, (Philadelphia: Norsworthy, G.D. ed.), pp. 360–368.
- Obert, L.A., Hoover, E.A. (2000). Relationship of lymphoid lesions to disease course in mucosal feline immunodeficiency virus type C infection. *Vet. Pathol.* 37, 386–401.
- Oka, T., Ohtsuki, Y., Sonobe, H., Furihata, M., Miyoshi, I. (1990). Suppressive effects of interferons on the production and release of human T-lymphotropic virus type-I (HTLV-I). *Arch. Virol.* 115, 63–73.
- Okumura, A., Lu, G., Pitha-Rowe, I., Pitha, P.M. (2006). Innate antiviral response targets HIV-1 release by the induction of ubiquitin-like protein ISG15. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103, 1440–1445.
- Olmsted, R.A., Langley, R., Roelke, M.E., Goeken, R.M., Adger-Johnson, D., Goff, J.P., Albert, J.P., Packer, C., Laurenson, M.K., Caro, T.M. (1992). Worldwide prevalence of lentivirus infection in wild feline species: epidemiologic and phylogenetic aspects. *J. Virol.* 66, 6008–6018.
- Orandle, M.S., Crawford, P.C., Levy, J.K., Udoji, R., Papadi, G.P., Ciccarone, T., Mergia, A., Johnson, C.M. (2000). CD8+ thymic lymphocytes express reduced levels of CD8beta and increased interferon gamma in cats perinatally infected with the JSY3 molecular clone of feline immunodeficiency virus. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 16, 1559–1571.
- Paillot, R., Richard, S., Bloas, F., Piras, F., Poulet, H., Brunet, S., Andreoni, C., Juillard, V. (2005). Toward a detailed characterization of feline immunodeficiency virus-specific T cell immune responses and mediated immune disorders. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 106, 1–14.
- Paltrinieri, S., Crippa, A., Comerio, T., Angioletti, A., Roccabianca, P. (2007). Evaluation of inflammation and immunity in cats with spontaneous parvovirus infection: consequences of recombinant feline interferon-omega administration. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 118, 68–74.
- Paludan, S.R., Bowie, A.G. (2013). Immune sensing of DNA. *Immunity* 38, 870–880.
- Payment, P., y Trudel, M. (1993). *Methods and techniques in virology* (Marcel Dekker Inc).
- Pedersen, N.C., Meric, S.M., Ho, E. (1984). The clinical significance of latent feline leukemia virus infection in cats. *Feline Pract* 14, 32–48.
- Pedersen, N.C., Ho, E.W., Brown, M.L., Yamamoto, J.K. (1987). Isolation of a T-lymphotropic virus from domestic cats with an immunodeficiency-like syndrome. *Science* 235, 790–793.
- Pedersen, N.C., Yamamoto, J.K., Ishida, T., Hansen, H. (1989). Feline immunodeficiency virus infection. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 21, 111–129.
- Pedersen, N.C., Barlough, J.E. (1991). Clinical overview of feline immunodeficiency virus. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 199, 1298–1305.

- Pedretti, E., Passeri, B., Amadori, M., Isola, P., Di Pede, P., Telera, A., Vescovini, R., Quintavalla, F., Pistello, M. (2006). Low-dose interferon-alpha treatment for feline immunodeficiency virus infection. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 109, 245–254.
- Petty, C.S., Tompkins, M.B., y Tompkins, W.A. (2008). Transforming growth factor-beta/transforming growth factor-betaRII signaling may regulate CD4+CD25+ T-regulatory cell homeostasis and suppressor function in feline AIDS lentivirus infection. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* 47, 148–160.
- Phadke, A.P., de la Concha-Bermejillo, A., Wolf, A.M., Andersen, P.R., Baladandayuthapani, V., y Collisson, E.W. (2006). Pathogenesis of a Texas feline immunodeficiency virus isolate: an emerging subtype of clade B. *Vet. Microbiol.* 115, 64–76.
- Phillips, K., Arai, M., Tanabe, T., Raskin, R., Volz, M., Uhl, E.W., Yamamoto, J.K. (2005). FIV-infected cats respond to short-term rHuG-CSF treatment which results in anti-G-CSF neutralizing antibody production that inactivates drug activity. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 108, 357–371.
- Pinches, M.D.G., Helps, C.R., Gruffydd-Jones, T.J., Egan, K., Jarrett, O., Tasker, S. (2007). Diagnosis of feline leukaemia virus infection by semi-quantitative real-time polymerase chain reaction. *J. Feline Med. Surg.* 9, 8–13.
- Plettenberg, A., Kern, P., Dietrich, M., y Meigel, W. (1990). [Recombinant interferon alpha-2A in the treatment of HIV-associated Kaposi sarcoma. Long-term results]. *Med. Klin. (Munich)* 85, 647–652.
- Pocacqua, V., Provasi, E., Paltrinieri, S., Gelain, E., Comunian, C., y Ceciliani, F. (2005). Glycan moiety modifications of feline alpha1-acid glycoprotein in retrovirus (FIV, FeLV) affected cats. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 107, 17–26.
- Poli, A., Abramo, F., Matteucci, D., Baldinotti, F., Pistello, M., Lombardi, S., Barsotti, P., Bendinelli, M. (1995a). Renal involvement in feline immunodeficiency virus infection: p24 antigen detection, virus isolation and PCR analysis. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 46, 13–20.
- Poli, A., Falcone, M.L., Bigalli, L., Massi, C., Hofmann-Lehmann, R., Lombardi, S., Bendinelli, M., Lutz, H. (1995b). Circulating immune complexes and analysis of renal immune deposits in feline immunodeficiency virus-infected cats. *Clin. Exp. Immunol.* 101, 254–258.
- Poss, M.L., Mullins, J.I., Hoover, E.A. (1989). Posttranslational modifications distinguish the envelope glycoprotein of the immunodeficiency disease-inducing feline leukemia virus retrovirus. *J. Virol.* 63, 189–195.
- Poulet, H., Brunet, S., Boularand, C., Guiot, A.L., Leroy, V., Tartaglia, J., Minke, J., Audonnet, J.C., Desmettre, P. (2003). Efficacy of a canarypox virus-vectored vaccine against feline leukaemia. *Vet. Rec.* 153, 141–145.
- Prokunina-Olsson, L., Muchmore, B., Tang, W., Pfeiffer, R.M., Park, H., Dickensheets, H., Hergott, D., Porter-Gill, P., Mummy, A., Kohaar, I., et al. (2013). A variant upstream of IFNL3 (IL28B) creating a new interferon gene IFNL4 is associated with impaired clearance of hepatitis C virus. *Nat. Genet.* 45, 164–171.
- Pu, R., Coleman, J., Coisman, J., Sato, E., Tanabe, T., Arai, M., Yamamoto, J.K. (2005). Dual-subtype FIV vaccine (Fel-O-Vax FIV) protection against a heterologous subtype B FIV isolate. *J. Feline Med. Surg.* 7, 65–70.
- Quackenbush, S.L., Donahue, P.R., Dean, G.A., Myles, M.H., Ackley, C.D., Cooper, M.D., Mullins, J.I., Hoover, E.A. (1990). Lymphocyte subset alterations and viral determinants of immunodeficiency disease induction by the feline leukemia virus FeLV-FAIDS. *J. Virol.* 64, 5465–5474.
- Quaranta, M.G., Mattioli, B., Giordani, L., y Viora, M. (2004). HIV-1 Nef equips dendritic cells to reduce survival and function of CD8+ T cells: a mechanism of immune evasion. *FASEB J.* 18, 1459–1461.
- Quigley, J.G., Burns, C.C., Anderson, M.M., Lynch, E.D., Sabo, K.M., Overbaugh, J., Abkowitz, J.L. (2000). Cloning of the cellular receptor for feline leukemia virus subgroup C (FeLV-C), a retrovirus that induces red cell aplasia. *Blood* 95, 1093–1099.
- Quigley, J.G., Yang, Z., Worthington, M.T., Phillips, J.D., Sabo, K.M., Sabath, D.E., Berg, C.L., Sassa, S., Wood, B.L., Abkowitz, J.L. (2004). Identification of a human heme exporter that is essential for erythropoiesis. *Cell* 118, 757–766.
- Randall, R.E., Goodbourn, S. (2008). Interferons and viruses: an interplay between induction, signalling, antiviral responses and virus countermeasures. *J. Gen. Virol.* 89, 1–47.
- Ray, K., Gupta, S.M., Bala, M., Muralidhar, S., y Kumar, J. (2006). CD4/CD8 lymphocyte counts in healthy, HIV-positive individuals & AIDS patients. *Indian J. Med. Res.* 124, 319–330.
- Reinacher, M., Wittmer, G., Koberstein, H., y Failing, K. (1995). [The significance of FeLV infection for diseases in necropsied cats]. *Berl. Munch. Tierarztl. Wochenschr.* 108, 58–60.
- Riondato, F., Gianella, P., Guglielmino, R., Cagnasso, A., y Bo, S. (2003). Effects of interferon alpha (INF-alpha) therapy on peripheral blood lymphocyte subsets from FIV and FeLV naturally infected cats. *Vet. Res. Commun.* 27 Suppl 1, 429–432.
- Ritchey, J.W., Levy, J.K., Bliss, S.K., Tompkins, W.A., Tompkins, M.B. (2001). Constitutive expression of types 1 and 2 cytokines by alveolar macrophages from feline immunodeficiency virus-infected cats. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 79, 83–100.

- Rojko, J.L. (1986). Feline leukemia virus vaccines. *Semin. Vet. Med. Surg. Small Anim.* 1, 61–67.
- Rojko, J.L., Kociba, G.J. (1991). Pathogenesis of infection by the feline leukemia virus. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 199, 1305–1310.
- Rojko, J.L., Fulton, R.M., Rezanka, L.J., Williams, L.L., Copelan, E., Cheney, C.M., Reichel, G.S., Neil, J.C., Mathes, L.E., y Fisher, T.G. (1992). Lymphocytotoxic strains of feline leukemia virus induce apoptosis in feline T4-thymic lymphoma cells. *Lab. Invest.* 66, 418–426.
- Rojko, J., Hardy, W. (1994). Feline leukemia Virus. In *The Cat - Diseases and Clinical Management*, (Churchill Livingstone: Sherding, R.G. ed), pp. 263–432.
- Romen, F., Pawlita, M., Sehr, P., Bachmann, S., Schröder, J., Lutz, H., Löchelt, M. (2006). Antibodies against Gag are diagnostic markers for feline foamy virus infections while Env and Bet reactivity is undetectable in a substantial fraction of infected cats. *Virology* 345, 502–508.
- Rönblom, L., Eloranta, M.-L., y Alm, G.V. (2006). The type I interferon system in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 54, 408–420.
- Roy-Burman, P. (1995). Endogenous env elements: partners in generation of pathogenic feline leukemia viruses. *Virus Genes* 11, 147–161.
- Ruperez, C., Collado, V.M., y Miró, G. (2006). Epidemiología de la leucemia y la inmunodeficiencia felinas. *Canis et Felis* 82, 19–34.
- Saito, M., Nakagawa, M., Kaseda, S., Matsuzaki, T., Jonosono, M., Eiraku, N., Kubota, R., Takenouchi, N., Nagai, M., Furukawa, Y., et al. (2004). Decreased human T lymphotropic virus type I (HTLV-I) provirus load and alteration in T cell phenotype after interferon-alpha therapy for HTLV-I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis. *J. Infect. Dis.* 189, 29–40.
- Samuel, C.E. (2001). Antiviral actions of interferons. *Clin. Microbiol. Rev.* 14, 778–809, table of contents.
- Sanders, V.J., Wiley, C.A., Hamilton, R.L. (2001). The mechanisms of neuronal damage in retroviral infections of the nervous system. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 253, 179–201.
- Sarli, G., Salda, L. Della, Zaccaro, L., Bendinelli, M., Piedimonte, G., Marcato, P.S. (1998). Apoptotic fraction in lymphoid tissue of FIV-infected SPF cats. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 64, 33–44.
- Sas, A.R., Bimonte-Nelson, H.A., Tyor, W.R. (2007). Cognitive dysfunction in HIV encephalitic SCID mice correlates with levels of Interferon-alpha in the brain. *AIDS* 21, 2151–2159.
- Sas, A.R., Bimonte-Nelson, H., Smothers, C.T., Woodward, J., Tyor, W.R. (2009). Interferon-alpha causes neuronal dysfunction in encephalitis. *J. Neurosci.* 29, 3948–3955.
- Sato, K., Hida, S., Takayanagi, H., Yokochi, T., Kayagaki, N., Takeda, K., Yagita, H., Okumura, K., Tanaka, N., Taniguchi, T., et al. (2001). Antiviral response by natural killer cells through TRAIL gene induction by IFN-alpha/beta. *Eur. J. Immunol.* 31, 3138–3146.
- Schneider, W.M., Chevillotte, M.D., Rice, C.M. (2014). Interferon-stimulated genes: a complex web of host defenses. *Annu. Rev. Immunol.* 32, 513–545.
- Schoenborn, J.R., Wilson, C.B. (2007). Regulation of interferon-gamma during innate and adaptive immune responses. *Adv. Immunol.* 96, 41–101.
- Schröder, H.C., Müller, W.E. (1994). [Molecular virology founded models of anti-HIV therapy]. *Fortschr. Med.* 112, 438–443.
- Sellon, R.K., Hartmann, K. (2008). Infección por virus de inmunodeficiencia felina. In *Enfermedades Infecciosas Del Perro Y El Gato*, (Ciudad Autónoma de Buenos Aires: Editorial Inter-Médica S.A.I.C.I.), pp. 146–158.
- Sen, G.C. (2001). Viruses and interferons. *Annu. Rev. Microbiol.* 55, 255–281.
- Severa, M., Fitzgerald, K.A. (2007). TLR-mediated activation of type I IFN during antiviral immune responses: fighting the battle to win the war. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 316, 167–192.
- Sheets, M.A., Unger, B.A., Giggelman, G.F., Tizard, I.R. (1991). Studies of the effect of acemannan on retrovirus infections: clinical stabilization of feline leukemia virus-infected cats. *Mol. Biother.* 3, 41–45.
- Shelton, G.H., Linenberger, M.L. (1995). Hematologic abnormalities associated with retroviral infections in the cat. *Semin. Vet. Med. Surg. Small Anim.* 10, 220–233.
- Shimajima, M., Miyazawa, T., Ikeda, Y., McMonagle, E.L., Haining, H., Akashi, H., Takeuchi, Y., Hosie, M.J., Willett, B.J. (2004). Use of CD134 as a primary receptor by the feline immunodeficiency virus. *Science* 303, 1192–1195.

- Shirazi, Y., Pitha, P.M. (1992). Alpha interferon inhibits early stages of the human immunodeficiency virus type 1 replication cycle. *J. Virol.* 66, 1321–1328.
- Shirazi, Y., Pitha, P.M. (1993). Interferon alpha-mediated inhibition of human immunodeficiency virus type 1 provirus synthesis in T-cells. *Virology* 193, 303–312.
- Short, W.R. (2009). Managing the Care of Patients with HIV Infection. *Virtual Mentor* 11, 962–968.
- Sidky, Y.A., Borden, E.C. (1987). Inhibition of angiogenesis by interferons: effects on tumor- and lymphocyte-induced vascular responses. *Cancer Res.* 47, 5155–5161.
- Smith, R.S. (1991). The immune system is a key factor in the etiology of psychosocial disease. *Med. Hypotheses* 34, 49–57.
- Smith, J.W., Longo, D.L., Urba, W.J., Clark, J.W., Watson, T., Beveridge, J., Conlon, K.C., Sznol, M., Creekmore, S.P., Alvord, W.G. (1991). Prolonged, continuous treatment of hairy cell leukemia patients with recombinant interferon-alpha 2a. *Blood* 78, 1664–1671.
- Sommereyns, C., Paul, S., Staeheli, P., Michiels, T. (2008). IFN-lambda (IFN-lambda) is expressed in a tissue-dependent fashion and primarily acts on epithelial cells *in vivo*. *PLoS Pathog.* 4, e1000017.
- Soumelis, V., Scott, I., Gheys, F., Bouhour, D., Cozon, G., Cotte, L., Huang, L., Levy, J.A., Liu, Y.J. (2001). Depletion of circulating natural type 1 interferon-producing cells in HIV-infected AIDS patients. *Blood* 98, 906–912.
- Soumelis, V., Scott, I., Liu, Y.-J., Levy, J. (2002). Natural type 1 interferon producing cells in HIV infection. *Hum. Immunol.* 63, 1206–1212.
- Sparkes, A.H. (1997). Feline leukaemia virus: a review of immunity and vaccination. *J Small Anim Pract* 38, 187–194.
- Steed, V. (1987). Improved survival of four cats infected with feline leukemia virus after oral administration of interferon. *Feline Practice* 17, 24–30.
- Stewart, H., Adema, K.W., McMonagle, E.L., Hosie, M.J., Willett, B.J. (2012). Identification of novel subgroup A variants with enhanced receptor binding and replicative capacity in primary isolates of anaemogenic strains of feline leukaemia virus. *Retrovirology* 9, 48.
- Stuetzer, B., Brunner, K., Lutz, H., Hartmann, K. (2013). A trial with 3'-azido-2',3'-dideoxythymidine and human interferon- α in cats naturally infected with feline leukaemia virus. *J. Feline Med. Surg.* 15, 667–671.
- Sundstrom, M., Chatterji, U., Schaffer, L., de Rozières, S., Elder, J.H. (2008). Feline immunodeficiency virus OrfA alters gene expression of splicing factors and proteasome-ubiquitination proteins. *Virology* 371, 394–404.
- Swenson, C.L., Polas, P.J., Cheney, C.M., Kociba, G.J., Mathes, L.E. (1991). Prophylactic and therapeutic effects of phosphonoformate against feline leukemia virus *in vitro*. *Am. J. Vet. Res.* 52, 2010–2015.
- Taylor, C.S., Kabat, D. (1997). Variable regions A and B in the envelope glycoproteins of feline leukemia virus subgroup B and amphotropic murine leukemia virus interact with discrete receptor domains. *J. Virol.* 71, 9383–9391.
- Taylor, C.S., Willett, B.J., Kabat, D. (1999). A putative cell surface receptor for anemia-inducing feline leukemia virus subgroup C is a member of a transporter superfamily. *J. Virol.* 73, 6500–6505.
- Tanabe, T., Yamamoto, J.K. (2001). Feline immunodeficiency virus lacks sensitivity to the antiviral activity of feline IFN-gamma. *J. Interferon Cytokine Res.* 21, 1039–1046.
- Tandon, R., Cattori, V., Gomes-Keller, M.A., Meli, M.L., Golder, M.C., Lutz, H., y Hofmann-Lehmann, R. (2005). Quantitation of feline leukaemia virus viral and proviral loads by TaqMan real-time polymerase chain reaction. *J. Virol. Methods* 130, 124–132.
- Taylor, M.D., Korth, M.J., Katze, M.G. (1998). Interferon treatment inhibits the replication of simian immunodeficiency virus at an early stage: evidence for a block between attachment and reverse transcription. *Virology* 241, 156–162.
- Taylor, K.E., Mossman, K.L. (2013). Recent advances in understanding viral evasion of type I interferon. *Immunology* 138, 190–197.
- Tejerizo, G., Domenech, A., Illera, J.C., Collado, V.M., Gomez-Lucia, E. (2005). Effect of 17beta-estradiol and progesterone on the expression of FeLV in chronically infected cells. *Vet. Microbiol.* 109, 191–199.
- Tejerizo, G. (2007). Tesis doctoral Universidad Complutense: Efecto de las hormonas esteroideas sobre la expresión de los retrovirus felinos.
- Terwee, J.A., Yactor, J.K., Sondgeroth, K.S., Vandewoude, S. (2005). Puma lentivirus is controlled in domestic cats after mucosal exposure in the absence of conventional indicators of immunity. *J. Virol.* 79, 2797–2806.
- Teske, E., van Straten, G., van Noort, R., Rutteman, G.R. (2002). Chemotherapy with cyclophosphamide, vincristine, and prednisolone (COP) in cats with malignant lymphoma: new results with an old protocol. *J. Vet. Intern. Med.* 16, 179–186.

- Theilen, G.H., y Madewell, B.R. (1987). *Veterinary Cancer Medicine*. Philadelphia, Lea & Febiger, pp 183-196
- Theofilopoulos, A.N., Baccala, R., Beutler, B., y Kono, D.H. (2005). Type I interferons (alpha/beta) in immunity and autoimmunity. *Annu. Rev. Immunol.* 23, 307–336.
- Thyrell, L., Erickson, S., Zhivotovsky, B., Pokrovskaja, K., Sangfelt, O., Castro, J., Einhorn, S., Grandér, D. (2002). Mechanisms of Interferon-alpha induced apoptosis in malignant cells. *Oncogene* 21, 1251–1262.
- Tilton, J.C., Johnson, A.J., Luskin, M.R., Manion, M.M., Yang, J., Adelsberger, J.W., Lempicki, R.A., Hallahan, C.W., McLaughlin, M., Mican, J.M., et al. (2006). Diminished production of monocyte proinflammatory cytokines during human immunodeficiency virus viremia is mediated by type I interferons. *J. Virol.* 80, 11486–11497.
- Tilton, J.C., Manion, M.M., Luskin, M.R., Johnson, A.J., Patamawenu, A.A., Hallahan, C.W., Coglian-Shutta, N.A., Mican, J.M., Davey, R.T., Kottlil, S., et al. (2008). Human immunodeficiency virus viremia induces plasmacytoid dendritic cell activation *in vivo* and diminished alpha interferon production *in vitro*. *J. Virol.* 82, 3997–4006.
- Tompkins, W.A. (1999). Immunomodulation and therapeutic effects of the oral use of interferon-alpha: mechanism of action. *J. Interferon Cytokine Res.* 19, 817–828.
- Tompkins, M.B., Bull, M.E., Dow, J.L., Ball, J.M., Collisson, E.W., Winslow, B.J., Phadke, A.P., Vahlenkamp, T.W., Tompkins, W.A. (2002). Feline immunodeficiency virus infection is characterized by B7+CTLA4+ T cell apoptosis. *J. Infect. Dis.* 185, 1077–1093.
- Torres, A.N., Mathiason, C.K., Hoover, E.A. (2005). Re-examination of feline leukemia virus: host relationships using real-time PCR. *Virology* 332, 272–283.
- Truyen, U., Addie, D., Belák, S., Boucraut-Baralon, C., Egberink, H., Frymus, T., Gruffydd-Jones, T., Hartmann, K., Hosie, M.J., Lloret, A., et al. (2009). Feline panleukopenia. ABCD guidelines on prevention and management. *J. Feline Med. Surg.* 11, 538–546.
- Tsukahara, T., Kim, S., Taylor, M.W. (2006). REFINEMENT: a search framework for the identification of interferon-responsive elements in DNA sequences—a case study with ISRE and GAS. *Comput Biol Chem* 30, 134–147.
- Uckun, F.M., Chen, C.-L., Samuel, P., Pendergrass, S., Venkatachalam, T.K., Waurzyniak, B., Qazi, S. (2003). *In vivo* antiretroviral activity of stampidine in chronically feline immunodeficiency virus-infected cats. *Antimicrob. Agents Chemother.* 47, 1233–1240.
- Uddin, S., Fish, E.N., Sher, D.A., Gardziola, C., White, M.F., Platanias, L.C. (1997). Activation of the phosphatidylinositol 3-kinase serine kinase by IFN-alpha. *J. Immunol.* 158, 2390–2397.
- Uematsu, S., Akira, S. (2007). Toll-like receptors and Type I interferons. *J. Biol. Chem.* 282, 15319–15323.
- Uhl, E.W., Heaton-Jones, T.G., Pu, R., Yamamoto, J.K. (2002). FIV vaccine development and its importance to veterinary and human medicine: a review FIV vaccine 2002 update and review. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 90, 113–132.
- Uppal, S.S., Gupta, S., y Verma, S. (2003). Correlation of clinical and laboratory surrogate markers of immunodepletion with T cell subsets (CD4 & CD8) determined flow cytometrically in HIV infected patients: a hospital based study. *J Commun Dis* 35, 140–153.
- Vahlenkamp, T.W., De Ronde, A., Horzinek, M.C., Egberink, H.F. (1996). [Quantification of feline immunodeficiency virus (FIV) RNA in the plasma of infected cats]. *Berl. Munch. Tierarztl. Wochenschr.* 109, 265–269.
- VandeWoude, S., O'Brien, S.J., Hoover, E.A. (1997a). Infectivity of lion and puma lentiviruses for domestic cats. *J. Gen. Virol.* 78 (Pt 4), 795–800.
- VandeWoude, S., O'Brien, S.J., Langelier, K., Hardy, W.D., Slattery, J.P., Zuckerman, E.E., Hoover, E.A. (1997b). Growth of lion and puma lentiviruses in domestic cat cells and comparisons with FIV. *Virology* 233, 185–192.
- VandeWoude, S., Hageman, C.L., Hoover, E.A. (2003). Domestic cats infected with lion or puma lentivirus develop anti-feline immunodeficiency virus immune responses. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* 34, 20–31.
- Vedbrat, S.S., Rasheed, S., Lutz, H., Gonda, M.A., Ruscetti, S., Gardner, M.B., Prenskey, W. (1983). Feline oncornavirus-associated cell membrane antigen: a viral and not a cellularly coded transformation-specific antigen of cat lymphomas. *Virology* 124, 445–461.
- Vieillard, V., Strominger, J.L., y Debré, P. (2005). NK cytotoxicity against CD4+ T cells during HIV-1 infection: a gp41 peptide induces the expression of an NKp44 ligand. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102, 10981–10986.
- Volberding, P.A., Baker, K.R., y Levine, A.M. (2003). Human immunodeficiency virus hematology. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 294–313.
- Wang, F.-X., Huang, J., Zhang, H., Ma, X., y Zhang, H. (2008). APOBEC3G upregulation by alpha interferon restricts human immunodeficiency virus type 1 infection in human peripheral plasmacytoid dendritic cells. *J. Gen. Virol.* 89, 722–730.

- Watson, A.D.J., y Canfield, P.J. (2010). Nutritional Deficiency Anemias. En Schalm's veterinary hematology (Ames, Iowa: Wiley-Blackwell), 190-195.
- Weiss, R.C., Cummins, J.M., Richards, A.B. (1991). Low-dose orally administered alpha interferon treatment for feline leukemia virus infection. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 199, 1477-1481.
- Weiss, R.C., Cox, N.R., Boudreaux, M.K. (1993). Toxicologic effects of ribavirin in cats. *J. Vet. Pharmacol. Ther.* 16, 301-316.
- Weiss, D.J. (2003). New insights into the physiology and treatment of acquired myelodysplastic syndromes and aplastic pancytopenia. *Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.* 33, 1317-1334.
- Willett, B.J., Cannon, C.A., Hosie, M.J. (2002). Upregulation of surface feline CXCR4 expression following ectopic expression of CCR5: implications for studies of the cell tropism of feline immunodeficiency virus. *J. Virol.* 76, 9242-9252.
- Willett, B.J., Hosie, M.J. (2013). Feline leukaemia virus: half a century since its discovery. *Vet. J.* 195, 16-23.
- Willett, B.J., McMonagle, E.L., Logan, N., Spiller, O.B., Schneider, P., Hosie, M.J. (2007). Probing the interaction between feline immunodeficiency virus and CD134 by using the novel monoclonal antibody 7D6 and the CD134 (Ox40) ligand. *J. Virol.* 81, 9665-9679.
- Williams, B.R. (1991). Transcriptional regulation of interferon-stimulated genes. *Eur. J. Biochem.* 200, 1-11.
- Wolf, A. (2000). CVT: Update: Feline leukemia virus. In Kirk's Current Veterinary Therapy XIII, Small Practice, (Saunders, Philadelphia: Bonagura JD), pp. 280-284.
- Yamamoto, J.K., Pedersen, N.C., Ho, E.W., Okuda, T., Theilen, G.H. (1988a). Feline immunodeficiency syndrome--a comparison between feline T-lymphotropic lentivirus and feline leukemia virus. *Leukemia* 2, 204S - 215S.
- Yamamoto, J.K., Sparger, E., Ho, E.W., Andersen, P.R., O'Connor, T.P., Mandell, C.P., Lowenstine, L., Munn, R., Pedersen, N.C. (1988b). Pathogenesis of experimentally induced feline immunodeficiency virus infection in cats. *Am. J. Vet. Res.* 49, 1246-1258.
- Young, H.A. (1996). Regulation of interferon-gamma gene expression. *J. Interferon Cytokine Res.* 16, 563-568.
- Young, N., Abkowitz, J.L., Luzzatto, L. (2000). New insights into the pathophysiology of acquired cytopenias. In *Hematology*, (American Society Hematology, Education Program.), pp. 18-38.
- Zeidner, N.S., Myles, M.H., Mathiason-DuBard, C.K., Dreitz, M.J., Mullins, J.I., Hoover, E.A. (1990a). Alpha interferon (2b) in combination with zidovudine for the treatment of presymptomatic feline leukemia virus-induced immunodeficiency syndrome. *Antimicrob. Agents Chemother.* 34, 1749-1756.
- Zeidner, N.S., Rose, L.M., Mathiason-DuBard, C.K., Myles, M.H., Hill, D.L., Mullins, J.I., Hoover, E.A. (1990b). Zidovudine in combination with alpha interferon and interleukin-2 as prophylactic therapy for FeLV-induced immunodeficiency syndrome (FeLV-FAIDS). *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* 3, 787-796.
- Zhao, S., Cheng, D., Liu, E., Yu, H., Yang, H., Xue, X., y Chu, Y. (2008). Peginterferon vs. interferon in the treatment of different HCV genotype infections in HIV patients. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 27, 1183-1192.
- Zhu, Y., Antony, J., Liu, S., Martinez, J.A., Giuliani, F., Zochodne, D., Power, C. (2006). CD8+ lymphocyte-mediated injury of dorsal root ganglion neurons during lentivirus infection: CD154-dependent cell contact neurotoxicity. *J. Neurosci.* 26, 3396-3403.

ANEXOS

ANEXO I

FORMULARIO DE INCORPORACIÓN AL ESTUDIO DE ROFERON[®]

Código interno (a rellenar en el laboratorio):

DATOS DEL CLÍNICO

Veterinario responsable: _____

Clínica Veterinaria Asociada: _____

Dirección y nº teléfono: _____

DATOS DEL GATO

Nombre _____

Raza _____ Edad (años) _____ Sexo: ☐ ♂ / ☐ ♀ ☐ Castrado / ☒ Entero

Acceso al exterior: ☐ SI / ☐ NO Procedencia: ☐ Vagabundo/ ☐ Propietario

DATOS DE LA INFECCIÓN

Infección: ☐ FeLV ☐ FIV

Fecha del resultado positivo: / / Test empleado:

OBSERVACIONES: _____

ANEXO II

FICHA CLÍNICA DE LOS GATOS INCLUIDOS EN EL ESTUDIO CON ROFERON[®]

Código interno (a rellenar en el laboratorio) :

VISITA:

FICHA

Clínica Veterinaria Asociada: _____

Nombre del gato _____

Infección: ☐ FeLV ☐ FIV

CUESTIONARIO CLÍNICO (marcar con una X la respuesta que corresponda):

SIGNOS CLÍNICOS	PUNTUACIÓN CLÍNICA		
	0	1	2
Alteración apetito	No	Disorexia	Anorexia
Astenia	No	Leve-decaído	Grave-postrado
Deshidratación	No	<10%	>10%
Deterioro condición corporal	No	Delgadez	Caquexia
Linfoadenomegalia	No		Sí
Alteraciones de las mucosas	No	Palidez-Congestión	
Poliuria/Polidipsia	No	Sí	
Conjuntivitis	No		Sí
Queratitis	No		Sí
Lesiones orales	No		Sí
Alteraciones digestivas	No	Sí	
Lesiones cutáneas	No	Prurito, Alopecia	Úlceras
Alteraciones respiratorias	No	Leves	Graves
Alteraciones neurológicas	No		Sí
PUNTUACIÓN CLÍNICA TOTAL (a rellenar en el laboratorio) :			

OBSERVACIONES: _____

ANEXO III

CONSENTIMIENTO INFORMADO

Dña./D. _____
 con DNI _____,
 propietario del gato de nombre _____,
 doy mi consentimiento para que mi gato participe en el estudio titulado ***“Eficacia del Roferon® en el tratamiento de las retrovirosis felinas”***.

Declaro haber leído y aceptado el documento informativo del estudio adjunto, en el que se detallan los objetivos, la duración, la metodología de este estudio y los inconvenientes que representan (seguimiento de las consultas veterinarias, vigilancia del gato, prohibición de tratarlo con otros medicamentos), así como los riesgos y ventajas para el gato.

Igualmente se me ha informado sobre el derecho de renunciar a este ensayo clínico o de anular mi consentimiento en cualquier momento del estudio sin consecuencia alguna.

Acepto ceder los resultados que se obtengan de la anamnesis, exploración y análisis realizados a mi gato a lo largo del estudio al Grupo de Investigación, renunciando a cualquier derecho sobre ellos.

En conocimiento de causa, doy mi consentimiento y acepto libremente que mi animal participe en este estudio para el beneficio de su salud.

En _____ a _____ de _____ de 200 ____

Fdo: _____

Propietario

Fdo: _____

nº colegiado y sello
veterinario colaborador

DOCUMENTO INFORMATIVO DEL ESTUDIO CON ROFERON[®] PARA EL PROPIETARIO

1/ OBJETIVO DEL ESTUDIO

El objetivo de este estudio es comprobar la eficacia y tolerancia del Roferon[®] administrado oralmente durante 56 días, en el tratamiento de las infecciones por Leucemia e Inmunodeficiencia felina.

2/ DURACIÓN DEL ESTUDIO

Un año, a lo largo del cual está previsto realizar cuatro visitas que serán convenientemente programadas por su veterinario

3/ PROTOCOLO DEL ENSAYO

VISITA	PRIMERA	SEGUNDA	TERCERA	CUARTA
	INICIO DEL TRATAMIENTO	MITAD DEL TRATAMIENTO	FINAL DEL TRATAMIENTO	FINAL ESTUDIO
DÍA DESDE INICIO DEL TRATAMIENTO	0	60	120	300

En cada una de las visitas se realizará un examen clínico general y se tomará una muestra de sangre. Para la extracción de sangre y sólo cuando sea difícil el manejo del gato se recurrirá a su sedación, previa autorización del propietario.

Usted mismo tratará a su gato. Administrará una de las ampollas que le suministraremos, directamente en la boca o en la comida. El tratamiento consta de 56 ampollas que tendrá que administrar en semanas alternas a lo largo de un periodo de cuatro meses.

4/ OBLIGACIONES DEL ESTUDIO

Deberá respetar las fechas de visitas fijadas por su veterinario y no podrá administrar a su gato otros tratamientos sin consultar previamente a su veterinario.

5/ POSIBLES RIESGOS.

La bolsa y las ampollas suministradas con la medicación deberán mantenerse fuera del alcance de los niños. En el caso hipotético que un niño ingiera accidentalmente el producto, deberá informar a su médico y al veterinario para poder actuar correctamente.

6/ DERECHO A RENUNCIAR AL ENSAYO

La Directiva 92/18/EEC de la Comisión del 20 de Marzo de 1992, le autoriza a retirar su consentimiento y a declinar sus obligaciones en el estudio en todo momento, incluso si ha dado usted su acuerdo por escrito. Su gato continuará recibiendo toda la atención y cuidados de su veterinario. Le recomendamos que antes de tomar una decisión definitiva pida consejo a su veterinario, y le comunique su decisión ya que es él quien conoce mejor el estado de salud de su gato.

ANEXO IV

RESULTADOS NUMÉRICOS DE LAS ANALÍTICAS

ID	Visita	Htc	Hgb	Eritro	Leuc	Ntrf	Linf	Urea	Creat	ALT	Prot	Alb	α-s	γ-s	A/G	p27	RT	CD4 CD8	Real PCR
FelV-01	0	15	4,8	4,34	11,40	10,37	0,34	82	0,5	18	10,4	1,89	1,70	6,12	0,22	0,63	6,48	0,72	0,53
FelV-01	1	19	5,10	4,52	10,00	9,70	0,23	76	1,2	11	9,0	1,91	1,41	4,09	0,27	0,95	5,98	1,07	0,43
FelV-02	0	41	13,5	9,12	9,00	6,21	2,34	65	1,2	19	6,8	4,06	0,95	1,34	1,48	0,12	1,91	1,03	0,67
FelV-02	1	32	10,3	6,99	19,00	10,07	6,65	61	1,1	22	6,6	3,52	0,84	1,48	1,14	0,17	2,24	1,15	0,79
FelV-02	2	35	10,6	7,97	10,00	5,40	2,70	58	1,3	28	7,4	4,12	1,14	1,44	1,26	0,11	0,95		0,72
FelV-03	0	30	9,8	5,55	1,50	0,03	1,47	48	0,8	30	6,2	2,78	1,37	1,38	0,81	1,58	0,75	0,45	0,49
FelV-03	1	33	10,3	6,53	20,40	16,73	3,06	50	0,7	20	8,4	3,22	0,99	3,34	0,62	0,96	0,00	1,26	0,88
FelV-03	2	34	9,60	6,70	18,40	12,38	3,52	50	0,8	21	7,6	3,23	1,09	3,15	0,70	0,04	0,00	2,15	0,69
FelV-04	0	45	15,7	10,54	12,80	8,06	3,20	42	1,1	13	8,8	3,54	1,29	3,40	0,67	0,64	3,95	1,28	0,39
FelV-04	1							57	1,6	17	7,2	2,63	1,53	2,11	0,58	0,18	0,00		0,49
FelV-04	2	38	14,30	9,80	15,30	3,96	9,71									0,13	0,00	1,97	0,48
FelV-05	0	32	11,1	7,88	9,70	6,80	3,60	43	1,2	16	8,0	3,21	1,23	2,92	0,67	1,19	0,35	1,48	0,54
FelV-05	1	44	13,5	9,80	28,50	21,66	5,70	46	1,1	19	8,0	3,32	1,15	2,69	0,71	0,45	0,00	1,56	0,64
FelV-05	2	35	10,5	6,59	3,70	0,33	2,37	76	2,0	31	8,2	3,15	1,13	2,97	0,62	0,07	0,00	1,71	0,47
FelV-06	0	42	14,80	10,02	0,01	7,20	4,50	76	1,4	47	9,4	3,25	1,12	4,52	0,53	0,40	6,44		0,76
FelV-06	1	28	8,5	6,08	49,80	38,84	8,47	54	0,9	51	7,8	2,83	1,37	2,97	0,57	0,33	4,35	1,96	1,01
FelV-06	2	47	15	11,60	50,20	39,49	9,91				8,2	3,02	1,15	2,91	0,58	0,07	0,00	1,77	0,83
FelV-07	0	16	4,50	5,45	0,00	1,35	1,26	53	1,2	35	6,2	3,50	0,81	1,26	1,34	0,94	0,03	2,15	0,59
FelV-07	1							57	0,8	109	5,8	2,79	1,37	0,97	0,92	0,48	0,00		0,52
FelV-07	2	38	11	8,53	12,30	2,90	7,30	69	1,2	27	7,2	3,12	1,22	2,02	0,76	0,33	0,00	2,29	0,46
FelV-07	3	30	9,2		25,90	19,68	4,14	51	1,2	13	7,8	3,42	1,30	1,83	0,78	1,02	0,03	1,93	0,69
FelV-08	0	42	13,8	8,36	10,00	6,70	2,40	87	1,4	32	8,4	3,24	1,14	3,57	0,63	0,54	0,00	2,2	0,67
FelV-08	1	38	12,40	7,53	13,80	4,51	7,46	44	1,3	23	8,6	3,56	0,88	3,39	0,70	0,07	0,00	3,25	0,89
FelV-08	2	32	10	7,16	13,10	5,11	6,94	67	1,1	20	6,9	3,96	1,29	1,47	1,35	0,15	0,00	2,86	0,55
FelV-08	3	18	5,6	3,67	18,70	16,46	0,56	110	1,5	135	7,8	3,03	1,39	2,59	0,64	0,67	9,88	2,11	0,76
FelV-09	0	23	7,6	4,44	4,50	2,88	1,31	70	0,9	17	6,2	2,77	1,03	1,81	0,81	0,75	57,26	0,86	0,57
FelV-09	1	30	9,9	9,33	27,10	21,68	3,52	47	0,6	25	7,8	3,07	1,04	2,72	0,65	0,25	0,00	0,72	0,97
FelV-09	2	38	12,2	8,55	6,10	3,78	1,83	94	2,0	15	9,4	3,11	1,33	3,73	0,49	0,06	0,00	1,09	0,79
FelV-09	3	38	12,2	8,55	7,10	4,15	2,85	94	2,0	15	9,4	3,11	1,33	3,73	0,49	0,06	0,00		0,73
FelV-10	0	10	3,4	2,04	0,01	1,11	10,95	51	1,0	22	6,0	3,48	0,95	1,06	1,38	0,84	11,45	0,64	0,55
FelV-10	1	17	5,80	3,54	3,00	1,20	1,31	52	1,3	25	9,6	3,42	1,13	4,34	0,55	1,27	10,52		0,69
FelV-11	0	34	10,6	7,17	1,80	0,05	1,66	58	1,1	24	6,5	4,05	0,98	0,94	1,71	0,67	0,98	0,98	0,77
FelV-11	1	40	12,5	7,63	24,10	17,35	5,06	53	1,1	20	9,4	3,34	1,08	4,10	0,55	0,68	0,00	1,53	0,87
FelV-11	2	34	12,40	14,10	8,50	4,93	3,06									0,67	0,90	2,21	0,92
FelV-12	0	42	13,4	10,03	10,80	1,62	7,88	66	1,2	31	6,6	3,46	1,44	1,05	1,10	0,05	0,21		1,07
FelV-12	1	36	11,6	9,03	24,60	16,24	6,64	74	0,8	44	8,0	2,83	1,16	3,25	0,55	0,30	0,19	1,56	0,77
FelV-12	2	32	11,80	11,31	20,40	15,49	4,35	58	1,2	35	10,4	2,54	1,28	6,32	0,34	0,33	0,46		0,82
FelV-13	0	35	11,4	7,27	7,30	4,16	2,70	57	1,5	19	6,6	4,08	0,93	1,05	1,62	0,58	0,00	3,91	0,79
FelV-13	1	41	12,5	8,49	12,50	8,88	2,88	54	1,1	36	8,4	3,41	1,14	2,92	0,68	0,25	0,00	2,25	0,93
FelV-13	2	37	12,1	8,26	7,00	1,40	4,13	110	1,9	20	10,2	3,56	1,44	3,60	0,54	0,06	0,00	2,39	0,99
FelV-14	0	30	10,6	11,50	5,30	2,81	1,91	47	1,2	37	6,2	2,52	0,98	2,25	0,68	0,24	0,00	2,45	0,63
FelV-14	1	35	13,7		7,90	1,26	6,48	52	1,7	36	7,6	4,62	0,96	1,14	1,55	0,62	0,00		0,49
FelV-14	2	38	12,5	8,02	7,20	3,89	2,45	62	1,3	28	6,4	4,20	1,07	0,71	1,91	1,51	0,00	3,16	0,77

ID	Visita	Htc	Hgb	Eritro	Leuc	Ntrf	Linf	Urea	Creat	ALT	Prot	Alb	α-s	γ-s	A/G	p27	RT	CD4 CD8	Real PCR
FeLV-14	3	26	6,8		19,80	15,05	4,55	49	1,1	15	6,8	3,30	1,13	1,58	0,94	0,65	0,00	3,28	0,84
FeLV-15	0	17	4,8	4,15	6,50	1,30	5,20	47	0,8	39	5,8	2,75	1,06	1,35	0,90	0,50	3,46	0,66	0,60
FeLV-15	1	26	7,8	7,63	12,90	7,61	3,61	47	0,8	25	8,2	3,06	1,13	3,16	0,60	0,17	0,00	1,12	0,88
FeLV-15	2	28	7,50	7,74	8,50	4,93	3,06				8,6	3,21	0,80	3,45	0,59	0,46	3,29	1,32	0,59
FeLV-16	0	47	14,3	10,36	4,10	2,17	1,35	56	1,0	20	6,2	3,53	0,85	1,07	1,33	0,20	0,00	2,12	0,87
FeLV-16	1	29	9,3	5,41	21,00	14,28	6,51				7,0	3,29	1,38	1,55	0,89	0,75	0,00	3,16	0,61
FeLV-16	2	30	8,9	7,01	7,70	2,31	4,39	57	0,8	24	6,2	2,60	1,13	1,92	0,72	0,94	0,00	2,68	1,25
FeLV-17	0	43	13,7	10,53	8,40	6,22	1,76	47	1,4	17	6,6	3,79	0,97	1,12	1,35	0,37	0,00	2,57	0,86
FeLV-17	1	29	9,1	5,41	5,40	2,43	2,59	44	1,1		6,6	3,52	1,23	1,26	1,15	0,21	0,00	2,6	0,87
FeLV-17	2							84	1,0		7,8	3,35	1,32	2,16	0,75	1,31	0,00	2,72	1,21
FeLV-17	3	30	8,70	7,67	8,70	4,76	3,16	55	1,3	42	8,4	3,85	1,15	2,03	0,85	0,66	0,00		0,49
FeLV-18	0	36	12,5	9,33	9,60	1,15	7,68	74	1,8	25	6,4	4,22	0,74	0,86	1,94	0,05	0,00	1,52	0,62
FeLV-18	1	36	10,7	9,27	22,40	13,66	5,60	60	0,9	85	7,6	3,33	1,11	2,43	0,78	0,32	0,00	1,66	0,81
FeLV-18	3	20	6,5	4,25	10,70	6,85	2,57	31	0,8	15	7,0	3,17	0,94	2,09	0,83	0,06	0,00	1,54	0,72
FeLV-19	0	36	11,9	7,08	12,50	9,75	2,25	58	1,3	32	8,2	4,05	1,16	2,04	0,98	0,33	0,10		0,64
FeLV-19	1	44	13,5		6,60	2,38	4,09	61	1,7	26	9,4	3,70	1,14	3,85	0,65	0,08	0,00	0,87	0,94
FeLV-19	2	47	15	11,60	8,50	4,93	3,06	52	1,3	25	9,6	3,42	1,13	4,34	0,55	0,11	0,00	0,84	0,96
FeLV-20	0	22	7,50	4,45	0,01	6,70	3,87	54	1,3	30	7,2	4,01	1,34	1,19	1,26	0,40	0,15	1,98	0,65
FeLV-20	1	52	16,6	11,99	8,40	3,95	3,53	66	1,1	35	8,2	2,63	1,53	2,11	0,47	0,06	0,00	2,2	0,87
FeLV-20	2	37	11,1	7,11	5,90	4,07	0,83	45	2,0	22	8,8	2,94	1,36	3,55	0,50	0,06	0,15	1,05	0,80
FeLV-20	3	21	6,09	4,86	58,40	57,23	1,17	35	0,5	27	6,4	3,25	1,16	1,16	1,03	0,26	0,77	2,34	0,65
FeLV-21	0	24	10,20	8,54	0,01	7,33	3,05	52	0,9	27	6,7	4,31	0,78	1,08	1,80	0,88	2,05	2,08	0,88
FeLV-21	1	28	8,4	7,52	9,80	6,47	1,08	52	0,7	25	7,6	2,90	1,39	2,71	0,62	0,62	0,18	1,72	0,86
FeLV-22	0	39	13,2	10,12	6,30	3,72	2,33	52	1,6	18	6,4	3,59	0,89	1,23	1,27	0,61	0,00	1,87	0,76
FeLV-22	1	38	10,2	8,61	18,90	12,70	4,20	56	1,3	19	6,6					0,40	0,00	2,31	0,67
FeLV-22	2	39	12,3	7,93	7,40	3,70	3,18	35	1,0	44	6,8	4,52	1,05	0,54	1,98	0,58	0,00		1,02
FeLV-22	3	34	12,2	7,23	5,00	2,20	2,65	52	1,5	54	8,4	4,11	1,16	2,21	0,96	1,03	0,78	2,31	0,39
FeLV-23	0	41	13,4	9,08	4,60	2,12	2,16	57	1,7	54	6,8	3,51	1,24	1,52	1,07	0,53	1,87	2,23	0,52
FeLV-23	1	29	8,6	6,48	4,20	1,97	1,64	47	1,7	13	8,6	2,74	1,06	4,15	0,47	0,48	0,00	2,39	0,62
FeLV-23	2	38	12,7	9,00	5,40	2,05	2,92				6,2					0,04	0,00	3,59	0,87
FeLV-23	3	29	10,7	7,64	5,40	2,97	2,00	59	1,0	33	8,2					1,06	0,03	3,1	0,72
FeLV-24	0	18	6,2	4,83	14,20	11,08	2,84	58	1,5	45	7,4	3,61	1,16	1,93	0,95	0,10	0,00	2,7	0,72
FeLV-24	1	23	6,8	5,84	29,40	24,11	3,53	70	1,1	37	8,2	2,85	1,45	2,92	0,53	0,05	0,00		0,64
FeLV-24	2	32	10,1	9,17	7,10	2,20	3,34	57	0,9	24	7,4	2,97	1,22	2,49	0,67	0,65	0,68	2,34	1,09
FeLV-24	3	54	16,2	8,33	19,50	15,30	2,80	62	1,2	15	9,6	3,01	1,23	4,73	0,46	1,24	0,00	3,11	0,71
FeLV-25	0	31	10,1	6,64	7,17	3,60	3,46	49	0,9	47	5,8	2,92	1,03	1,23	1,01	0,43	0,81	0,79	0,79
FeLV-25	2	36	14,20		9,43	2,76	6,48	54	1,6	39	7,4	4,52	0,98	1,05	1,48	0,05	0,00	1,67	1,05
FeLV-26	0	50	15,4	10,54	8,70	2,10	4,40	72	1,3	32	8,2	4,05	1,25	1,83	0,98	0,54	0,89		0,64
FeLV-26	3	25	7,90		4,40	2,90	1,45	48	0,9	29	7,0	3,68	1,24	1,39	1,11	0,79	0,97	1,24	0,86
FeLV-27	0	20	7,1	5,60	10,30	7,11	2,78	37	0,6	24	10,5	2,56	1,53	6,25	0,30	0,10	0,00	1,6	0,84
FeLV-27	1	45	14	10,44	13,20	8,05	4,36	72	1,5	36	8,4	3,30	1,41	2,69	0,65	0,69	0,96	1,51	0,66
FeLV-27	2	38	11,7	7,76	11,30	5,65	4,75	46	1,2	20	8,2	2,44	1,51	3,19	0,42	1,11	0,99	2,29	0,61
FeLV-27	3	25	7,9	5,85	7,90	4,27	3,63	20	0,6	6	6,6	2,61	1,23	1,96	0,65	0,81	2,77	2,82	0,74

ID	Visita	Htc	Hgb	Eritro	Leuc	Ntrf	Linf	Urea	Creat	ALT	Prot	Alb	α-p	γ-p	A/G	CD4 CD8	Real PCR
FIV-01	0	38	11,6	8,24	4,80	1,80	2,40	56	1,1	44	7,7	3,45	0,85	2,37	0,81	0,75	0,89
FIV-01	1	47	14,7	10,63	4,30	1,94	2,11	48	0,9	15	8,6	1,77	1,24	4,73	0,26	1,12	0,90
FIV-01	2	40	11,7	8,21	7,00	3,78	2,10	51	0,7	15	8,4	2,98	1,19	3,57	0,55	1,68	0,77
FIV-01	3	41	12,4	8,95	7,70	3,39	3,85	64	1,4	15	8,0	3,56	1,29	2,49	0,80	1,35	0,97
FIV-02	0	38	14,5	7,32	9,10	3,30	4,20	55	1,3	42	8,4	3,85	1,15	2,60	0,84		0,94
FIV-02	1	32	9,4	6,33	7,30	4,96	1,46	154	1,9	50	8,0	3,31	1,12	2,77	0,71	1,98	0,94
FIV-02	2	33	10,7	8,01	9,90	5,15	3,56		1,1	15	7,6	2,83	1,34	2,90	0,59	2,4	0,87
FIV-02	3	41	12,2	9,05	8,90	3,74	4,36	53	1,6	18	8,6	4,57	1,17	2,28	1,13	2,35	0,89
FIV-03	0	37	12,9	7,22	7,20	4,61	2,02	63	1,3	22	9,2	4,04	1,69	2,74	0,78	0,54	0,79
FIV-03	2	33	9,3	7,31	18,40	10,12	8,10	45	0,6	11	8,8	2,96	1,67	3,40	0,51	0,87	0,88
FIV-03	3	44	13,3	10,18	10,00	5,00	3,80	54	1,1	48	7,2	3,31	1,03	1,83	0,85		0,67
FIV-04	0	44	12,9	7,26	15,30	5,50	6,80	74	1,5	31	7,6	3,89	1,06	1,82	1,05	0,72	0,74
FIV-04	1	19	7	4,79	3,40	2,01	1,22	60	1,2	10	7,4	3,25	0,88	2,37	0,79	1,24	0,91
FIV-04	2	37	13,2	10,43	4,20	1,68	1,72	54	1,1	31	7,0	3,13	0,97	2,07	0,81	1,15	0,80
FIV-05	0	34	10,1	5,68	4,60	1,84	2,53	48	1,5	25	8,4	4,07	1,07	2,40	0,94	1,14	0,88
FIV-05	1	35	11,5	7,20	8,50	2,98	5,51	51	1,4	24	8,9	3,50	1,14	4,05	0,69	1,86	0,98
FIV-05	3	45	10,5	8,85	9,90	3,10	4,60	48	1,2	18	7,6	2,94	0,97	3,15	0,57	1,1	0,79
FIV-06	0	30	9,2	6,35	25,90	19,68	4,14	51	1,2	13	7,8	3,42	1,30	1,83	0,78	0,27	0,90
FIV-06	1	41	10,8		19,60	11,96	5,49	56	1,1	46	10,0	3,55	1,75	3,78	0,55	1,94	1,03
FIV-06	2	21	7,1	4,37	6,20	2,91	2,60	70	0,9	23	8,2	4,87	0,95	1,64	1,47		0,94
FIV-06	3	34	10,9	8,44	8,20	4,76	2,79	50	1,3	24	7,6	3,39	0,97	2,30	0,81	0,76	0,71
FIV-07	0	31	11,3	8,65	13,40	9,78	3,35	47	0,9	38	7,4	3,67	1,13	1,95	0,98	0,64	0,88
FIV-07	1	32	11,8		25,50	15,30	7,40	48	1,1	15	8,6	2,49	1,49	3,95	0,41	0,9	0,90
FIV-07	2							47	1,2	13	8,4	2,89	0,97	3,75	0,53	0,77	0,90
FIV-07	3	43	10,7	9,46	8,00	1,40	4,90	59	1,3	22	8,2	3,46	1,15	2,52	0,73	0,68	0,87
FIV-08	0	26	6,8	7,24	19,80	15,05	4,55	49	1,1	15	6,8	3,30	1,13	1,58	0,94		0,88
FIV-08	1	36	11,6	8,20	7,10	4,76	1,85	66	1,4	22	6,8	3,46	1,19	1,60	1,04	0,65	0,95
FIV-08	2	32	9,7	6,92	10,60	6,25	3,50	58	0,8	21	8,0	2,91	0,99	3,42	0,57	1,67	0,91
FIV-08	3	35	8,7	6,50	6,20	1,00	4,10	57	1,3	22	7,0	3,74	1,02	1,42	1,15	0,59	0,79
FIV-09	0	19	5,9	3,85	4,30	0,99	2,58	82	1,5	37	9,0	3,35	1,12	4,15	0,60	1,35	0,77
FIV-09	2	33	10,1	6,34	17,90	5,19	11,28	50	1,5	21	8,6	2,84	1,35	3,79	0,49	1,76	0,89
FIV-09	3	42	12,9	9,48	10,80	2,59	7,78	47	1,3	29	7,8	3,71	0,90	2,21	0,90	2,54	0,98
FIV-10	0	28	9,4	6,87	8,20	3,69	4,26	43	1,3	12	6,0	3,25	0,80	1,27	1,18	0,82	0,74
FIV-10	1	34	11,2	7,99	8,00	2,72	3,68	42	1,5	20	8,2	2,55	0,86	4,06	0,45	1,12	0,94
FIV-10	2							45	0,9	14	7,8	2,92	1,02	3,06	0,60		0,97
FIV-10	3	38	11,8	8,17	9,00	3,06	5,76	69	1,4	28	6,6	3,63	1,09	1,24	1,22		0,80
FIV-11	0	25	9,6	6,77	6,70	1,61	4,49	42	1,1	39	8,0	3,62	1,07	2,69	0,83	0,48	0,68
FIV-11	1	30	10,6	8,20	13,50	4,59	7,43	40	0,8	14	7,2	3,61	1,10	1,81	1,01	0,89	0,76
FIV-11	2	33	10,7	6,83	16,10	6,44	8,21	57		27	7,6	3,22	0,98	2,79	0,74	1,3	0,81
FIV-11	3	29	8,2	6,82	18,20	3,40	10,70	169	6,0	12	8,2	2,20	1,14	4,05	0,37	1,04	0,93
FIV-12	0	40	12,3	8,47	15,30	3,00	1,70	39	1,3	27	6,2	2,11	0,88	1,47	0,52		0,75
FIV-12	2							28	1,3	49	6,6						0,74
FIV-12	3	38	12	6,76	5,20	1,82	2,91	65	1,2	44	7,6	2,84	1,05	2,96	0,60	2,48	0,94
FIV-13	0	18	5,6	3,67	18,70	16,46	0,56	110	1,5	135	7,8	3,03	1,39	2,59	0,64	0,86	0,68
FIV-13	1	32	8,8	7,08	4,00	0,20	3,68	45	1,3	75	6,8	2,79	0,87	2,22	0,70	1,09	0,82
FIV-13	3	42	13,5	8,24	5,60	3,80	2,00	62	1,4	18	7,6	4,38	1,08	1,32	1,36		0,72
FIV-14	0	37	12	7,06	5,90	2,30	2,71	56	1,5	37	8,6	3,36	1,47	2,87	0,64	0,42	0,80
FIV-14	2	37	11,3	9,20	17,10	13,68	2,91	51	1,2	24	8,0					0,88	0,79
FIV-15	0	22	5,4	4,54	6,20	2,34	3,75	87	2,0	41	8,2	3,24	1,24	3,34	0,66	0,74	0,87

ID	Visita	Htc	Hgb	Eritro	Leuc	Ntrf	Linf	Urea	Creat	ALT	Prot	Alb	α-p	γ-p	A/G	CD4 CD8	Real PCR
FIV-15	1	35	13	9,38	8,70	2,52	5,66	47	0,8	8	11,0	3,16	1,69	5,04	0,40	1,05	0,98
FIV-15	2	45	13	9,15	9,00	6,80	1,30									0,58	0,80
FIV-16	0	37	11,5	7,62	9,40	6,30	1,10	48	1,2	26	6,4	3,37	0,87	1,30	1,11	0,34	0,84
FIV-16	1	39	12,1	8,73	6,80	3,40	2,58	52	1,3	14	7,5	3,71	1,02	2,02	0,98	0,75	1,03
FIV-17	0	38	12,5	8,02	7,20	3,89	2,45	62	1,3	28	9,0	3,53	1,63	3,22	0,65	1,18	0,81
FIV-17	1	42			7,00	3,01	3,71	53	1,0	9	6,8	3,31	1,13	1,75	0,95		0,74
FIV-17	2	44	12,3	8,54	9,80	3,15	3,48	55	1,1	10	10,9	3,51	1,09	5,68	0,50	1,56	0,69
FIV-17	3	43	13	9,82	5,60	0,80	4,20	53	1,3	31	7,4					1,42	0,82
FIV-18	0	21	6,09	4,86	58,40	57,23	1,17	35	0,5	27	6,4	3,25	1,16	1,16	1,03	0,79	0,79
FIV-18	2	31	9,6	6,09	17,80	11,75	3,20	67	1,9	16	9,6	2,57	0,88	5,45	0,37	0,96	0,87
FIV-18	3	31	9,1	6,99	31,00	26,97	3,41	42	1,1	81	5,0	1,69	0,66	2,60	0,51	0,72	0,94
FIV-19	0	25	7,9	6,02	4,40	2,90	1,45	48	0,9	29	7,0	3,68	1,24	1,39	1,11	1,14	0,88
FIV-19	1	23	6,9	5,49	15,50	9,15	4,50	46	1,3	18	7,0	3,23	0,84	2,31	0,86	1,58	0,87
FIV-19	2	42	11,8	8,25	9,10	3,20	3,80	57	1,0	9	8,8	2,83	1,09	4,20	0,47	1,32	0,75
FIV-19	3	39	9,9	5,51	8,30	3,50	1,70	48	1,5	19	7,0	3,55	1,02	1,60	1,03	1,06	0,76
FIV-20	0	38	11,5	8,05	5,80	2,42	2,78	34	1,2	13	7,0	3,25	1,04	1,98	0,87	0,48	0,91
FIV-20	1	23	6,6		12,90	5,68	4,52	75	1,1	21	8,0	2,34	1,05	3,95	0,41		0,84
FIV-20	2	26	8,2	6,20	17,60	12,14	4,22	87	1,6	19	9,6	2,50	0,99	5,26	0,35	1,41	0,84
FIV-20	3	36	11,1	8,50	7,70	5,54	1,46	75	1,4	27	7,8	3,45	1,00	2,44	0,79		0,81
FIV-21	0	24	7,2	4,26	29,10	19,21	7,86	66	0,8	7	8,0	2,52	1,21	3,50	0,46	0,51	0,80
FIV-21	1	29	9,1	6,00	7,90	5,29	2,53	60	1,5	31	7,6	3,42	1,48	2,14	0,82	0,72	0,79
FIV-21	2	28	8,7	5,70	7,50	5,20	2,35	58	1,3	32	7,4	3,25	1,05	2,75	0,78		0,87
FIV-22	0	33	10,8	7,35	5,00	1,60	2,60	100	2,0	20	8,4	3,52	1,02	2,95	0,72	0,69	0,82
FIV-22	1	28	9,7	6,70	6,10	4,27	1,46	60	1,1	16	6,2	3,50	0,68	1,80	1,30	1,32	1,08
FIV-22	2							126	3,6	10	12,0	3,01	1,07	7,05	0,33	1,06	0,92
FIV-22	3	47	14,6	10,93	5,00	0,65	4,25	52	1,1	33	8,0	3,15	1,22	2,50	0,65	1,09	0,72
FIV-23	0	31	9,5	6,84	9,90	3,30	3,90	48	1,7	32	9,2	3,80	1,31	3,12	0,70	0,39	0,73
FIV-23	1							69	1,6	82	9,6	4,07	1,65	2,74	0,74	0,54	0,84
FIV-23	3	41	12,9	10,08	6,90	2,69	2,55	53	1,2	53	7,6	3,74	0,79	2,09	0,97	0,47	0,85
FIV-24	0	34	10,3	6,92	2,60	1,61	0,70	43	0,8	29	8,0	3,08	1,24	3,00	0,63		0,79
FIV-24	1	38	12,3	9,95	7,80	1,87	5,07	53	1,4	14	7,2	3,69	0,94	1,92	1,05	0,78	0,86
FIV-24	2	50	14,3	8,75	18,60	5,60	8,90	57	1,3	36	7,4	3,33	1,03	2,37	0,82	3,08	0,89
FIV-24	3	24	7,5	6,83	25,60	17,66	4,35	67	1,1	92	9,4	3,61	1,47	3,18	0,62	1,33	0,87
FIV-25	0	38	12,8	7,38	6,00	2,76	2,88	52	1,5	33	9,0	3,63	1,29	3,16	0,68	1,18	0,78
FIV-25	2	36	10,7	9,41	15,40	10,47	4,62										0,82
FIV-25	3	22	7	6,80	17,10	10,43	3,59	88	1,9	116	11,8	5,14	1,91	3,29	0,77	0,71	0,92
FIV-26	0	29	10,7	7,64	5,40	2,97	2,00	59	1,0	33	8,2	3,54	1,35	2,93	0,76	1,33	0,82
FIV-26	1	38	11,5	5,46	21,30	9,30	10,70	36	1,3	15	8,3	2,55	0,76	3,25	0,44		0,99
FIV-26	2	31	9	5,32	22,40	8,70	12,70	58	1,5	28	9,5	3,25	1,35	4,24	0,52	1,49	1,00
FIV-27	0	54	16,2	8,33	19,50	15,30	2,80	62	1,2	15	9,6	3,01	1,23	4,73	0,46		0,76
FIV-27	1	24	6,4	8,08	15,80	12,30	2,10				9,8	3,20	1,05	5,54	0,47	1,54	0,76
FIV-27	2	30	9	5,45	20,40	15,30	4,08	93	1,5	22	10,6	3,70	0,83	5,98	0,53	1,68	1,04
FIV-27	3	38	11,9	7,77	7,60	3,50	3,80	59	1,2	42	6,8	3,75	0,82	1,19	1,23	2,26	0,86
FIV-28	0	35	10,8	6,93	10,90	5,34	5,34	28	1,2	18	6,0	3,06	0,85	1,44	1,04	1,05	0,77
FIV-28	1	37	11	7,95	7,70	4,47	2,77	107	1,1	25	10,4	4,50	1,61	3,65	0,71	1,32	1,13
FIV-28	2	31	8,9	5,46	24,00	7,20	10,70	78	2,5	15	9,8	2,55	0,81	6,07	0,35		1,09
FIV-28	3	39	11,8	7,75	6,40	3,26	2,88	61	1,5	34	6,8	3,54	1,24	1,41	1,09	1,97	0,99
FIV-29	0	25	7,5	4,99	8,40	1,26	4,79	128	1,8	27	8,4	3,52	1,27	3,23	0,73	0,86	0,94
FIV-29	1	36	12	9,37	11,90	9,76	1,90	44	1,1	13	9,6	3,28	0,98	4,36	0,57		1,07
FIV-29	3	26	8,4	5,04	7,14			24	2,3	35	10,7	3,36	1,15	5,21	0,46	1,47	0,95

ID	Visita	Htc	Hgb	Eritro	Leuc	Ntrf	Linf	Urea	Creat	ALT	Prot	Alb	α-p	γ-p	A/G	CD4 CD8	Real PCR
FIV-30	0	25	7,9	5,85	7,90	4,27	3,63	20	0,6	6	6,6	2,61	1,23	1,96	0,65	0,71	0,81
FIV-30	2	25	7,6	6,10	16,40	12,63	3,77	47	0,9	11	9,6	2,80	1,32	4,59	0,41	0,92	0,87
FIV-30	3	28	8,7	6,03	18,60	8,56	8,93	44	1,1	13	8,6	3,22	1,22	3,22	0,60	0,37	0,99
FIV-31	0	23	7,9	5,95	9,00	6,70	1,35	75	1,3	19	7,0	3,53	1,12	1,53	1,02	1,54	1,12
FIV-31	1	30	9,6		10,00	6,80	2,90	43	1,1	12	8,4	3,16	1,22	3,38	0,60	1,01	0,97
FIV-31	2	32	10,8	6,90	10,90	5,44	3,50	38	1,2	18	8,2	3,18	1,10	3,35	0,63	1,54	0,92

Htc., hematocrito (%);

Hgb., concentración de hemoglobina (g/dl);

Eritro., número de eritrocitos; (miles)

Leuc., número de leucocitos (miles);

Ntrf., número de neutrófilos;

Linf., número de linfocitos.

Urea, concentración de urea;

Creat, concentración de creatinina;

Prot., concentración de proteínas totales;

Alb., concentración de albúmina;

α-s, concentración de alfa globulinas;

γ-s, concentración de gamma globulinas;

A/G, cociente albúmina/globulinas

P27 proteína p27 y de la

RT actividad RT

Real PCR